



**SAPIENZA**  
UNIVERSITÀ DI ROMA

**DIPARTIMENTO di SCIENZE ANATOMICHE,  
ISTOLOGICHE, MEDICO LEGALI e  
DELL'APPARATO LOCOMOTORE**

Sezione di Anatomia Umana

**DOTTORATO Di RICERCA  
in  
SCIENZE MORFOFUNZIONALI  
XXIX ciclo**

**“Valutazione dei parametri nemaspermici di  
spermatozoi umani vitrificati mediante liquido  
seminale artificiale,  
in assenza di crioprotettore”**

Relatore **Prof.ssa Stefania A. Nottola**

Candidata **Dott.ssa Selenia Miglietta**

Correlatore **Prof. Giuseppe Familiari**

**Anno Accademico 2015-2016**



# Indice

Indice .....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUZIONE .....	7
INFERTILITÀ E STERILITÀ .....	7
Cause di Infertilità e Sterilità .....	9
Infertilità Femminile .....	11
Infertilità Maschile.....	14
MORFOLOGIA GENERALE DELLO SPERMATOZOO .....	20
Struttura dello Spermatozoo .....	22
Diagnostica Seminale .....	24
PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA .....	32
Approccio alla Coppia Infertile .....	32
PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ.....	40
Criobiologia:Crioconservazione dei Gameti e Crioprotettori.....	40
Oncofertilità.....	44
Social Freezing .....	46
SCOPO DELLA TESI .....	48
MATERIALI E METODI .....	51
Liquido Seminale Artificiale .....	53
Vitrificazione e Scongellamento.....	54
Analisi Seminale .....	55
Microscopia Elettronica.....	57
Analisi Statistica .....	57
RISULTATI.....	59
Comparazione dei Parametri Nemaspermici tra i Gruppi a Fresco e i Vitrificati.....	59
Tassi di Recupero dei Parametri Vitali Post Scongellamento .....	60
Analisi Morfologica ed Ultrastrutturale.....	60
DISCUSSIONE .....	63
CONCLUSIONI .....	70
BIBLIOGRAFIA .....	71
DIDASCALIE DELLE FIGURE .....	82
TABELLE E GRAFICI .....	84
ICONOGRAFIA .....	86

# ABSTRACT

Uno dei problemi legati alla crioconservazione del liquido seminale è la riduzione dei parametri vitali quali la vitalità e la motilità. La crioconservazione può inoltre indurre modificazioni della normale morfologia della componente nemaspermica. Attualmente la crioconservazione è applicabile attraverso due metodologie: congelamento lento/scongelo rapido e vitrificazione/riscaldamento. Il primo metodo tende a prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare tramite un lento abbassamento della temperatura: in tal modo la cristallizzazione che avviene all'esterno della cellula dovrebbe non disturbare l'ambiente intracellulare; il secondo invece mira ad evitare la formazione di ghiaccio intracellulare attraverso un istantaneo abbassamento della temperatura facendo in modo che il tempo richiesto per la transizione termica non sia tale da permettere il passaggio di stato. Per crioconservare con successo limitando il danno intracellulare si utilizzano delle sostanze dette *crioprotettori*, che sono però particolarmente tossici per le cellule. Una questione controversa nel campo della crioconservazione/crioprotezione dei gameti riguarda la presenza o assenza del liquido seminale durante la crioconservazione degli spermatozoi. Il potenziale protettivo del liquido seminale è stato confermato dalla presenza in esso di ioni come zinco e di antiossidanti; esso può però contenere alti livelli, potenzialmente tossici, di specie reattive dell'ossigeno.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di testare gli effetti di un medium di coltura artificiale simile nella composizione al liquido seminale ma privo degli effetti collaterali negativi e valutare il suo effetto sugli spermatozoi umani andando ad analizzare una serie di parametri prima e dopo la vitrificazione. In particolare mediante analisi microscopica sono stati valutati motilità, vitalità, morfologia e ultrastruttura. Sono stati selezionati 30 campioni di liquido seminale e ogni campione è stato sottoposto a swim-up e successivamente trattato in modo da ottenere 5 gruppi di spermatozoi a fresco e vitrificati in diversi media: *HTF a fresco* (Human

Tubal Fluid), *ASF a fresco* (Artificial Seminal Fluid), *Vit HTF* (vitrification in Human Tubal Fluid), *Vit SF* (vitrification in Seminal Fluid), *Vit ASF* (vitrification in Artificial Seminal Fluid).

Dopo vitrificazione e scongelamento tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi seminale mediante l'utilizzo della Microscopia Ottica, e successivamente sono stati trattati per l'analisi ultrastrutturale mediante l'uso della Microscopia Elettronica a Trasmissione.

Nei gruppi a fresco HTF e ASF, tutti i parametri nemaspermici sono risultati simili e paragonabili. Invece, come era prevedibile, i parametri relativi alla morfologia normale, motilità e vitalità sono apparsi significativamente ridotte nei gruppi vitrificati rispetto a quelli a fresco ( $p<0.001$ ). Andando a paragonare i parametri in condizioni di vitrificazione diverse invece, la motilità progressiva, la vitalità e la normale morfologia sono significativamente più alte in Vit ASF rispetto a Vit HTF, mentre tutti i parametri risultano in generale migliori in Vit ASF rispetto a Vit SF ma solo la vitalità sembra differire in maniera significativa. I tassi di recupero di vitalità e della normale morfologia erano significativamente maggiori nel gruppo Vit ASF rispetto a Vit SF e Vit HTF ( $p<0.05$ ). I tassi di recupero della motilità progressiva e della normale morfologia erano significativamente maggiori nel gruppo Vit ASF rispetto a Vit HTF ( $p=0.03$ ). Analizzando le immagini scattate al microscopio elettronico a trasmissione degli spermatozoi a fresco e vitrificati, i campioni a fresco hanno mostrato membrana plasmatica intatta e normali acrosomi. Nonostante si sia notata una migliore preservazione nel gruppo Vit ASF sono stati osservati diversi tipi di danno in tutti i gruppi vitrificati, nei quali l'acrosoma è risultata la parte anatomica più sensibile al crio-danno. La membrana plasmatica ha mostrato molti difetti dopo lo scongelamento come rigonfiamento, rotture, raggrinzimenti. Nei nuclei dei vitrificati è stata osservata una minore elettrodensità rispetto ai controlli a fresco e sono state osservate inclusioni granulari, voluminosi vacuoli apparentemente vuoti e non delimitati da membrana posizionati

solitamente al centro del nucleo. I mitocondri sono apparsi tondi con creste poco definite e visibili.

In conclusione abbiamo potuto dimostrare che il liquido seminale (SF) può fungere da crioprotettore in soggetti normospermici. Abbiamo dimostrato inoltre che l'ASF può effettivamente meglio preservare tutti i parametri nemaspermici degli spermatozoi in confronto al SF, ma soprattutto in confronto al HTF, incrementato con albumina sierica e saccarosio.

# INTRODUZIONE

## INFERTILITÀ E STERILITÀ

La maggior parte degli adulti hanno progetti di vita che includono figli. Quando coloro che desiderano dei bambini incontrano problemi nel concepimento, la frustrazione, la disperazione e l'impotenza sono conseguenze comuni e debilitanti.

A tal proposito alcuni autori sostengono l'ipotesi in cui disturbi emozionali cronici e problemi psicosociali giocano un ruolo fondamentale nel determinare l'infertilità in almeno la metà dei casi, altri sostengono che il lungo iter diagnostico che accompagna le coppie contribuisce al mantenimento, se non al peggioramento dell'infertilità, mentre altri ancora pensano non ci possa essere una netta distinzione tra cause organiche e psicogene in quanto esse interagiscono tra loro in un complicato intreccio di variabili (Wright et al., 1989).

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) definisce sterilità la situazione di una coppia in cui uno o entrambi i membri sono affetti da una condizione fisica permanente che non rende possibile il concepimento. La sterilità è dunque una situazione che causa la totale mancanza di capacità riproduttiva, della coppia o di un suo componente.

È necessario distinguere bene il concetto di sterilità da quello di infertilità, anche perché nei Paesi di lingua anglosassone il termine *infertility* sta ad indicare la sterilità.

Secondo l'OMS si parla di infertilità quando una coppia per cause relative all'uomo o alla donna non riesce ad ottenere una gravidanza dopo 24 mesi di rapporti mirati e non protetti; l'infertilità riguarda il 25% di loro (Vignati, 2011). Il termine infertilità quindi, al contrario della sterilità, non si riferisce ad una condizione assoluta bensì ad una situazione generalmente risolvibile e legata ad uno o più fattori interferenti. L'infertilità è dunque la condizione più frequentemente affrontata e possibilmente trattata nell'ambito delle procedure relative alla Procreazione Medicalmente Assistita (PMA).

Viene usualmente riportata un'infertilità organica ed una psicogena. Un tempo le percentuali di casi ritenuti ad eziologia psicogena o inspiegata (sine causa) raggiungevano anche il 50%, oggi l'affinamento delle tecniche e delle conoscenze hanno ridotto tali percentuali ad una media del 5% (Seibel & Taymor, 1982). Tuttavia ciò non esclude che anche nelle infertilità funzionali non siano implicati, tramite meccanismi psicosomatici, anche fattori emozionali; si è visto per esempio che in alcuni casi anche dopo la rimozione della causa organica l'infertilità persiste (Morse & Van Hall, 1987). La componente psico-emozionale può incidere, quindi, sulla fertilità con meccanismi diversi, attraverso il sistema neurovegetativo e neuroendocrino, creando così disfunzioni acute e croniche e a volte vere e proprie alterazioni d'organo. Probabilmente in



molti casi le componenti somatiche e quelle psicologiche sono inseparabili e ciò induce sempre più spesso a considerare una multifattorialità di cause nella eziopatogenesi dell'infertilità (Graziottin, 1989; Morse & Van Hall, 1987).

I dati raccolti dal Registro Nazionale sulla PMA dicono che: l'infertilità maschile è del 29,3%, quella femminile del 37,1%, di coppia 17,6%, idiopatica del 15,1% (*Infertilità e tecniche di PMA, 2006 – aggiornato 2015*).

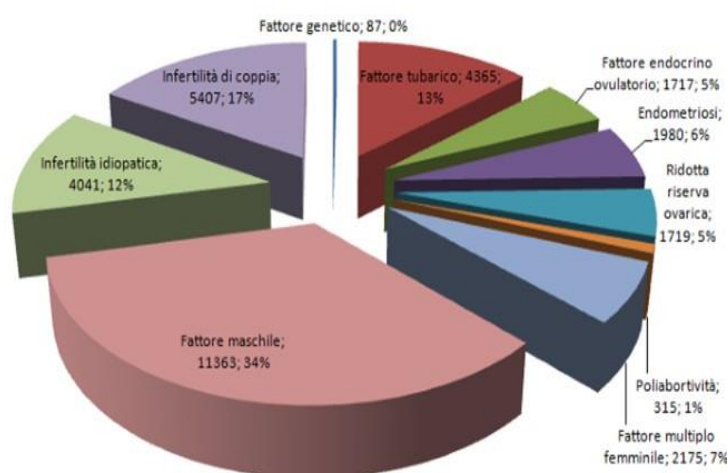
### **Cause di Infertilità e Sterilità**

Le cause che predispongono alla difficoltà di concepire sono diverse; l'età per esempio. Le donne italiane si sposano in media a 28 anni e partoriscono il primo figlio a 30; ciò che porta le coppie a rimandare la genitorialità sono sicuramente la sicurezza economica, una maturità emotiva o la ricerca di una sufficiente organizzazione familiare. Tutto questo richiede tempo, così che quando si ritiene di essere pronti ad avere un figlio, spesso è troppo tardi; il periodo più fertile per la donna è tra i 20-25 anni, resta alto fino ai 35 ma subisce un netto peggioramento dai 35 ai 40, fino a rendersi bassissimo oltre i 40; in particolare nei Paesi occidentali l'emancipazione della donna ha portato la ricerca di una gravidanza in età più avanzata e quindi un outcome riproduttivo di coppia meno efficace. E' stato inoltre dimostrato che un solo rapporto settimanale riduce la probabilità di gravidanza del 50% rispetto ad una frequenza di rapporti sessuali a giorni alterni durante tutto il periodo periovulatorio, si rende

quindi necessaria una frequenza assidua e mirata dei rapporti sessuali (Schmid et al., 2007).

Anche le *abitudini alimentari*, (Jurewicz et al., 2016) come particolari diete o la continua variabilità del peso corporeo sono associati ad una modifica del ciclo mestruale nella donna e variazioni dei parametri seminali nell'uomo. Sempre di più quindi un ruolo fondamentale lo acquistano lo *stile di vita*; l'eventuale *uso di droghe* (Bracken et al., 1990), l'*abuso di alcool* (Homan et al., 2007), il *fumo*, le *condizioni lavorative* particolarmente pesanti e l'*inquinamento* che influenzano un assetto ormonale evidentemente necessario (Gabrielsen & Tanrikut, 2016).

È possibile suddividere l'infertilità di coppia sulla base delle principali cause distinguibili in: fattore femminile 35%; fattore maschile 30%; fattori combinati 20%; causa inspiegata 15%.



**Indicazione alla PMA in Italia dati registro Nazionale PMA 2007**  
(<http://giuseppemariolentini.magix.net/public/fattore%20femminile.htm>).

## **Infertilità Femminile**

L'infertilità nella donna può dipendere da cause genitali o extragenitali che ne hanno compromesso la funzionalità: Si distinguono diversi fattori:

*fattore endocrino*: detta anche infertilità anovulatoria, si manifesta con una mancata ovulazione dovuta ad una secrezione ormonale patologica; la funzionalità ovarica e la funzione ovulatoria dipendono da un'attività primitiva dell'ovaio e da alcuni stimoli ormonali che originano dall'asse ipotalamo-ipofisi e raggiungono l'ovaio stimolandone appunto l'ovulazione (Zollner et al., 2001).

La classificazione proposta dall'OMS prevede la suddivisione dei disturbi ovulatori in:

- Gruppo I: fallimento ipotalamico ipofisario:
  - Donne con amenorrea e assenza di segni di produzione di estrogeni, livelli di prolattina entro i limiti, bassi livelli di FSH, assenza di segni di lesioni anatomiche della regione ipotalamo-ipofisaria.
- Gruppo II: disfunzione ipotalamica ipofisaria:
  - Donne con varie alterazioni del ciclo mestruale quali insufficienza della fase luteale, cicli anovulatori, sindrome dell'ovaio policistico, assenza di mestruazioni, con presenza di produzione di estrogeni e normali livelli di FSH e prolattina.
- Gruppo III: fallimento ovarico:
  - Donne con assenza di mestruazioni, assenza di segni di funzionalità ovarica, alti livelli di FSH e valori di prolattina normali.

- Gruppo IV: alterazione congenita o acquisita dell'apparato riproduttivo:
  - Donne con assenza di mestruazioni che non rispondono alla somministrazione ripetuta di estrogeni.
- Gruppo V: Donne con infertilità, iperprolattinemia e lesioni a livello della regione ipotalamico-ipofisaria:
  - Donne con vari disturbi del ciclo, alti livelli di prolattina e lesioni a livello della regione ipotalamico-ipofisaria.
- Gruppo VI: Donne con infertilità, iperprolattinemia e assenza di lesioni a livello della regione ipotalamico-ipofisaria:
  - Donne con vari disturbi del ciclo, alti livelli di prolattina senza lesioni a livello della regione ipotalamico-ipofisaria.
- Gruppo VII: Donne con assenza di mestruazioni, valori nei limiti di prolattina e segni di lesioni nella regione ipotalamico-ipofisaria:
  - Donne con bassi livelli di estrogeni e valori di prolattina nei limiti.

Tutte queste alterazioni possono concretizzarsi in condizioni patologiche tra cui possiamo annoverare: la sindrome dell'ovaio policistico (PCSO), la sindrome del follicolo non rotto luteinizzato, l'insufficienza luteinica e la menopausa precoce.

*fattore endometriale:* conosciuta anche come endometriosi, è una patologia che riguarda il 5-10% delle donne in età fertile e prevede la presenza di endometrio al di fuori della cavità uterina; solitamente la sede di invasione è l'addome e l'infiltrazione ectopica dell'endometrio può interessare ovaie, tube di Falloppio, utero, legamenti utero-sacrali e peritoneo. Talvolta

queste lesioni possono colpire anche organi esterni all'apparato riproduttore come intestino, vescica, reni, ureteri ecc. Tale tessuto ectopico va incontro alle stesse modificazioni dell'endometrio eutopico in relazione alla ciclicità ormonale caratteristica del ciclo mestruale. Questo fenomeno non fisiologico è causa d'infertilità per diversi meccanismi: le aderenze pelviche sembra impediscano il rilascio dall'ovaio o il trasporto lungo le tube dell'ovocita; non solo, molti studi suggeriscono inoltre che questa condizione di forte infiammazione pelvica possa modificare l'utero rendendolo ostile all'impianto dell'embrione, e possa compromettere la qualità ovocitaria e quella embrionale (Kitaya et al., 2016).

*fattore cervico-vaginale:* il fattore cervicale e quello vaginale sono interdipendenti, è indispensabile infatti che durante il naturale concepimento l'uomo deponga gli spermatozoi in un ambiente non ostile, è necessario quindi che le secrezioni vaginali e quelle cervicali siano idonee alla loro sopravvivenza. Difetti anatomici della vagina, vaginismo e vaginiti sono le cause più accreditate di infertilità, le vaginiti aumentano di molto l'acidità del PH vaginale determinando l'aumento di globuli bianchi e macrofagi che insieme a infezioni batteriche come la Clamidia, Gonococco o Micoplasma possono uccidere gli spermatozoi (Wilkowska – Trojnel et al., 2009).

*fattore tubarico:* anomalie anatomiche come l'eccessiva lunghezza, le oblitterazioni luminali delle tube, la compressione delle salpingi a causa di

aderenze provocate da interventi chirurgici addominali o da malattie infiammatorie come l'endometriosi, possono ostacolare la progressione dell'ovocita tra ovaio e salpinge o addirittura impedirla (Ricci et al., 2013).

*fattore uterino*: alterazioni nell'anatomia interna dell'utero possono provocare infertilità e aborti ripetuti; lo studio della cavità uterina può essere eseguito mediante isterosonografia e isteroscopia, metodiche che permettono di osservare il canale cervicale, la cavità endometriale e le tube. Esistono molte malformazioni congenite dove l'utero risulta assente (agenesia o aplasia uterina), o con un'incisura a livello del fondo (utero setto), diviso in due corni separati (utero bicerne) o formato da un unico corno (utero unicorne), arcuato o didelfo; spesso si riscontrano queste condizioni in donne con anamnesi di infertilità/sterilità (Acién, 1993).

*fattore immunologico*: talvolta anticorpi anti-embrione e/o anticorpi anti-spermatozoi (ASA) possono essere presenti nel muco cervicale e in altri tratti dell'apparato riproduttivo (Krzemiński, 1975).

## **Infertilità Maschile**

Nel passato, anche quello più recente, l'infertilità della donna ha costituito un forte pregiudizio, un "difetto" o una "colpa della diversità" da espiare con il ripudio o l'isolamento affettivo. Solo di recente nelle problematiche dell'infertilità si è valutata la responsabilità dell'uomo e la probabile inadeguatezza del liquido seminale come causa della mancata genitorialità. La maggior parte degli uomini non fa prevenzione e non consulta un

andrologo preventivamente, dato particolarmente grave visto che molte condizioni di infertilità maschile sono legate a patologie uro-genitali curabili; il 50% dei giovanissimi infatti soffre di infezioni genitali, come varicocele, idrocele, ipospadia, tumori dei testicoli, ecc, malattie che possono avere un grosso impatto sulla fertilità futura. Oggi più di prima questo tipo di patologie sono più difficili da intercettare anche perché prima con la vecchia visita di leva, oggi non più obbligatoria, c'era un vero e proprio screening di massa dove si diagnosticava il varicocele almeno in un ragazzo su due.

Classicamente le cause di infertilità maschile vengono divise in: pretesticolari, testicolari e post-testicolari.

Le *cause pretesticolari* sono quelle condizioni in cui le gonadi sono potenzialmente normofunzionanti ma c'è un deficit o squilibrio o totale assenza di ormoni specifici a causa di anomalie a livello dell'asse ipotalamo-ipofisi. Possono essere congenite come nel caso della Sindrome di Kallman in cui la ridotta produzione dell'ormone di rilascio delle gonadotropine o GnRH determina un deficit nella produzione di FSH e LH e quindi ipogonadismo ipogonadotropo. Nella maggior parte dei casi si parla di cause pretesticolari acquisite a causa di adenomi ipofisari o altri tumori cerebrali.

Le *cause testicolari* sono patologie a livello delle gonadi:

Il **varicocele** è presente nel 15-20% della popolazione maschile adulta ed è una patologia che interessa la vascolarizzazione del testicolo. Il testicolo è irrorato prevalentemente dall'arteria genitale (*arteria testicolare*), che origina direttamente dall'aorta addominale e raggiunge il margine posteriore del testicolo seguendo il funicolo spermatico. Le *vene testicolari* in parte profonde e in parte superficiali, si riuniscono a livello del margine posteriore dell'organo in grossi tronchi i quali, dopo aver raccolto le vene dell'epididimo si portano in alto ed entrano a far parte del funicolo spermatico dove si anastomizzano fra loro costituendo il plesso pampiniforme. Quest'ultimo dà origine alla vena testicolare che a destra sbocca direttamente nella vena cava inferiore e a sinistra nella vena renale sinistra. Viene definita *varicocele* la dilatazione e l'incontinenza delle vene testicolari; le vene dilatate determinano un innalzamento di pochi gradi della temperatura del testicolo che, se persiste, può determinare infertilità. Il varicocele è una condizione patologica che insorge solitamente tra i 15 e i 25 anni, eccezionalmente prima e di rado nella vecchiaia; la patogenesi non è molto chiara, il fatto più probabile è che sia determinata da una congenita debolezza delle pareti venose associata ad un'incontinenza delle valvole (Baigorri & Dixon, 2016).

L'**orchite** solitamente si associa alla parotite, altrimenti conosciuta come "orecchioni" e si manifesta come un'inflammazione di uno o entrambi i



testicoli. Gli esiti sulla spermatogenesi dipendono dall'entità della flogosi (Schuppe et al., 2010).

Il **criptorchidismo** è la mancata discesa di uno o di entrambi i testicoli. La prima fase della discesa testicolare avviene tra la decima e la quindicesima settimana di gestazione; la seconda fase, diversamente dalla prima, è androgeno-dipendente e avviene tra la ventiseiesima e la quarantesima settimana. Il criptorchidismo influenza in modo variabile la fertilità, in relazione al tipo, alla durata della patologia, ed agli interventi effettuati per correggerla; l'intervento si ritiene necessario prima dei due anni (Docampo & Hadziselimovic, 2015).

In generale i traumi a livello testicolare provocano danno tissutale con conseguente atrofia. La **torsione del funicolo** spermatico è, in particolare, un'evenienza drammatica tale da richiedere l'intervento chirurgico per evitare la perdita del testicolo. L'alterazione della fertilità dipende dalla velocità con cui si riesce a riposizionare il testicolo (Graziotti et al., 1981).

**Anomalie genetiche** si riscontrano particolarmente nei maschi infertili, soggetti con cariotipo 47, XXY, nei quali la presenza di due cromosomi X porta una grave malformazione nella struttura dei testicoli caratterizzati da microrchidismo associato ad atrofia dei tubuli seminiferi, all'interno dei quali si possono trovare talvolta rarissimi spermatozoi. Questa aberrazione è caratteristica della sindrome di Klinefelter, la causa del 14% circa dei

pazienti azoospermici (Pralea & Mihalache, 2007). Soggetti portatori di altre aberrazioni cromosomiche nelle quali sono interessati i cromosomi X e Y, cariotipo 47, XXY/46, XY o soggetti con cariotipo 47, XYY presentano solitamente oligospermia, aspermia o azoospermia. È stato dimostrato che anche traslocazioni di 4 dei 15 geni della serie TET (Testis-Expressed-Transcript) causano sterilità (Reijo et al., 1995). Uno tra i più importanti fattori di azoospermia è il gene DAZ (Deleted in Azoospermia) presente in una regione specifica del cromosoma Y denominata AZFc (Azoospermia Factor). Altri geni come SF1 (Steroidogenic Factor1) e SOX1 (SRY-related HMG-box gene) attivi nelle cellule del Sertoli e Leydig, PGK2 trascritto negli spermatociti e PRM2 trascritto negli spermatidi, se mutati danno azoospermia non ostruttiva (Song et al., 2000). I **tumori testicolari** rappresentano oggi la patologia più frequente nei giovani adulti, con una grossa variazione geografica nell'incidenza, ma con una forte suscettibilità ereditaria. Figli di padri con tumore testicolare hanno un rischio di sviluppare il tumore, quadruplicato. Questi pazienti presentano una severa oligozoospermia (Ostrowski & Walsh, 2015).

Possono influenzare la corretta spermatogenesi e la qualità del liquido seminale: febbri, trattamenti farmacologici aggressivi (l'arresto definitivo della spermatogenesi può essere causato da farmaci antitumorali e dall'irradiazione della zona genitale nei pazienti oncologici), infezioni urinarie, epididimiti, malattie sessualmente trasmissibili (sifilide, gonorrea, clamidia, HPV). È ormai noto quanto i **fattori ambientali** influenzino la negativamente la fertilità: diversi fattori quali: farmaci, droghe, pesticidi,

radiazioni, stress, fumo, alcool sono infatti potenzialmente in grado di interferire sulla sfera sessuale e riproduttiva (Jurewicz et al., 2014).

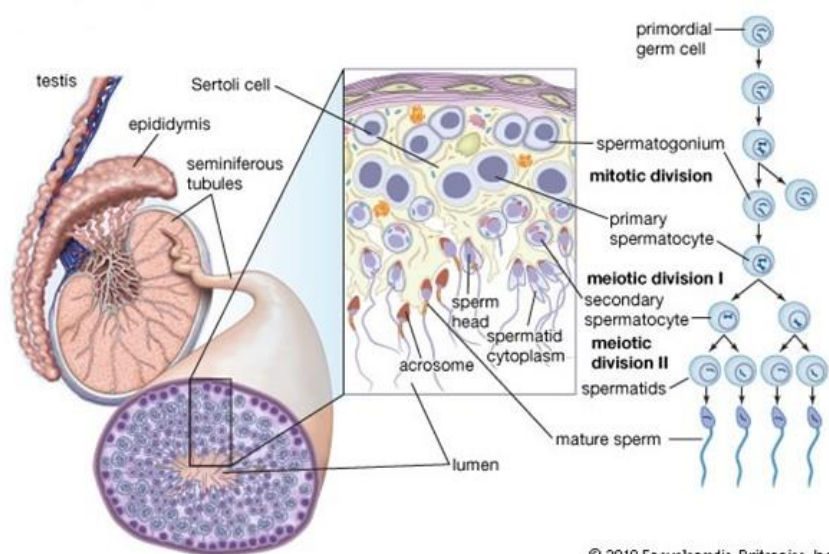
Rientrano nelle *cause post-testicolari* le forme di infertilità dovute ad un ostacolato passaggio degli spermatozoi lungo le vie seminali. Esistono **ostruzioni congenite o acquisite**; nel primo caso le ostruzioni si dividono in prossimali o distali in base alla sede anatomica in cui si trovano, e dipendono da una mancata produzione di uno o più tratti delle vie seminali. Quelle prossimali interessano l'epididimo e/o i dotti deferenti e in base ai vari gradi di ostruzione potranno dare oligozoospermia o azoospermia più o meno severa. Le ostruzioni distali interessano soprattutto i dotti eiaculatori (Goluboff et al., 1995).

Un'altra causa importante di infertilità maschile è l'**immunoinfertilità**; i dati della letteratura indicano che l'8-10% dei pazienti infertili presenta un'infertilità da autoimmunità antispermatozoo. Gli ASA possono essere prodotti sia dall'uomo che dalla donna, e vanno ad interferire con diverse fasi del concepimento, quali la risalita dello spermatozoo nelle vie genitali femminili, l'interazione con la zona pellucida dell'ovocita e lo sviluppo embrionale precoce. Essi si localizzano in diverse parti dello spermatozoo, quelli sulla coda per esempio tendono ad immobilizzarli e a farli agglutinare tra loro, quelli sulla testa invece possono impedire l'attraversamento del muco cervicale femminile durante l'eiaculazione e, nel caso in cui l'ovocita venga raggiunto, possono rendere complicata la fecondazione (Cui et al., 2015).

# MORFOLOGIA GENERALE DELLO SPERMATOZOO

Anton Van Leeuwenhoek fu il primo ad identificare gli spermatozoi all'interno del liquido seminale. Analizzandolo al microscopio egli notò dei corpi rotondi che chiamò *animalculi*; prelevando lo sperma da soggetti sani e da soggetti malati identificò la moltitudine di animalculi dotati di una testa che terminava indietro con una coda lunga 5 o 6 volte più del corpo, e riferì che essi “nuotavano come serpenti aiutati dalla loro coda” nel liquido seminale (Karamanou et al., 2010). Una delle caratteristiche intrinseche degli spermatozoi è proprio il movimento, che è strettamente correlato alla loro struttura; mediante un processo chiamato *spermiogenesi*, alla fine del processo di divisione meiotica lo spermatide si trasforma in spermatozoo ancora immobile, che acquisirà la motilità solo all'interno dell'epididimo (Sullivan & Mieusset, 2016). La spermiogenesi è una trasformazione esclusivamente fenotipica dello spermatide in spermatozoo, da non confondere con la *spermatogenesi*, processo precedente la spermiogenesi durante il quale da una cellula germinale diploide, lo spermatogonio, in grado di replicarsi mitoticamente, si arriva allo spermatide, cellula aploide derivante dal completamento della meiosi. I diversi stadi maturativi delle cellule germinali coinvolte nella spermatogenesi si possono identificare nell'epitelio germinativo dei tubuli seminiferi. Lo *spermatogonio*, che corrisponde alla prima fase maturativa, poggia sulla membrana basale costituita dai prodotti delle cellule del

Sertoli e delle cellule mioidi peritubulari. Gli spermatogoni sono divisi in base alla loro fisiologia e morfologia in due tipi: quelli di tipo A hanno il compito di mantenere il pool di cellule staminali mentre quelli di tipo B saranno destinati a differenziarsi in *spermatociti primari* i quali duplicano il proprio DNA e successivamente vanno incontro alla prima divisione meiotica che termina con la formazione degli *spermatociti secondari*; tali cellule sono aploidi ma con un corredo cromosomico raddoppiato per la presenza di due cromatidi per ogni cromosoma; solo con la seconda divisione meiotica i cromatidi segregano ognuno nel nucleo di una delle due cellule figlie, dette *spermatidi*. A questo punto in 13-16 giorni, senza ulteriori divisioni, gli spermatidi diverranno *spermatozoi* maturando strutture specifiche quali il flagello e l'acrosoma. Man mano che le cellule germinali progrediscono nella meiosi si spostano dal compartimento basale a quello adluminale del tubulo seminifero, fino ad essere rilasciate nel lume del tubulo stesso, una volta completata la spermatogenesi e la spermiogenesi (Griswold, 2016).



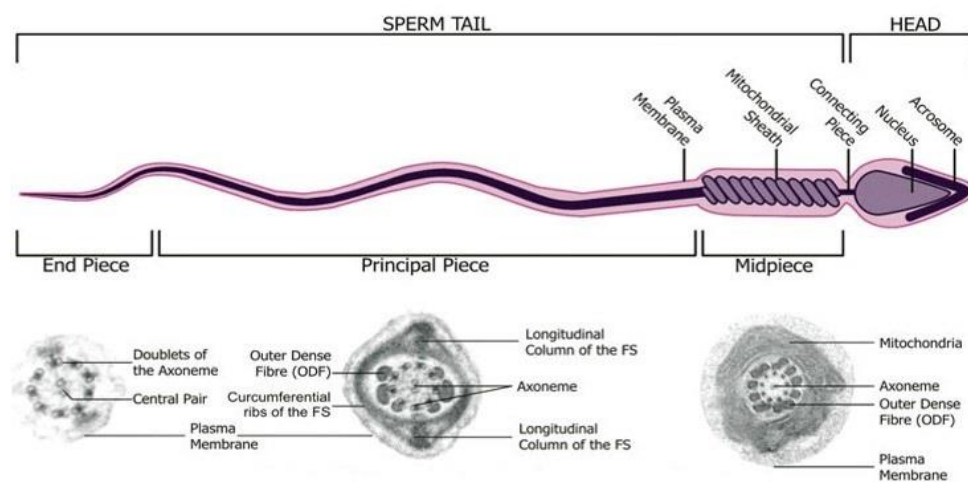
**Spermatogenesis:** 2010 Encyclopædia Britannica, Inc.

## Struttura dello Spermatozoo

Lo spermatozoo si divide in due principali segmenti: testa e flagello (coda) comprendente anche il segmento di connessione (o collo); la testa ha una struttura piriforme leggermente appiattita, è lunga circa 5  $\mu\text{m}$  e comprende il nucleo, che appare come una massa compatta di cromatina altamente condensata, con corredo cromosomico aploide, e l'acrosoma, un grosso lisosoma ricco di enzimi litici (ialuronidasi, acrosina, lipasi), alcuni ancorati alla faccia interna della membrana acrosomiale, necessari al momento della fecondazione per la digestione dei rivestimenti dell'ovocita (cumulo ooforo e zona pellucida) (reazione acrosomiale). Il flagello, lungo circa 60  $\mu\text{m}$ , può essere diviso in tre porzioni: il segmento *medio*, che secondo gli standard morfologici del World Health Organization (WHO) 2010 comprende anche il segmento di connessione, o collo; quello *principale* e quello *terminale*; esso ha una struttura cilindrica centrale detta *assonema* che ha un'architettura simile ad altre strutture mobili della superficie cellulare, quali le ciglia vibratili. L'assonema è costituito da una coppia centrale di microtubuli e da nove doppiette periferiche di microtubuli; ogni doppietta è composta da due subunità A e B. La subunità A di ogni doppietta è provvista da bracci di dineina con attività ATPasica la cui azione permette il movimento del flagello.

Nel segmento *medio* l'assonema è circondato da nove fibre dense esterne, una per ogni doppietta periferica, che supportano la motilità dello spermatozoo e proteggono la delicata struttura interna; le fibre esterne dense sono a loro volta circondate da una *guaina mitocondriale*. Il ruolo

dei mitocondri presenti a questo livello è quello di fornire ATP ai bracci di dineina prima citati. A livello del segmento *principale* la protezione dell'assonema è garantita da una *guaina fibrosa*, una sorta di esoscheletro costituito da due colonne laterali. Infine nell'ultimo tratto c'è un assottigliamento del flagello nelle porzioni caudali, costituito dalla sola struttura microtubulare assonemica rivestita dalla membrana plasmatica.



**Immagine della struttura di uno spermatozoo con sezioni trasversali di coda osservate al microscopio elettronico a trasmissione (Borg et al., 2009).**

A maturazione morfologica completata lo spermatozoo deve andare incontro ad un'ulteriore maturazione funzionale, in due fasi: la *mobilitazione* che avviene nell'epididimo e la *capacitazione* che avviene nelle tube uterine femminili. A differenza di altri gruppi animali in cui gli spermatozoi sono pronti per interagire con l'ovocita, nei mammiferi gli spermatozoi eiaculati non sono ancora competenti alla fecondazione; ma lo diventano quando, lasciando l'epididimo, vengono in contatto con bicarbonato e calcio presenti nel plasma seminale. L'aumento della concentrazione esterna degli ioni bicarbonato insieme a quelli del calcio aumentano il PH intracellulare stimolando l'attività di un'adenilatociclastasi

ed il conseguente metabolismo del cAMP implicato nel pathway di attivazione di una proteinchinasi che fosforila proteine flagellari, determinandone la motilità. Avvengono numerose modifiche a livello della membrana plasmatica dello spermatozoo; un rimaneggiamento significativo delle molecole di superficie porta alla formazione di specifici domini necessari alla successiva interazione con l'ovocita. La capacitazione ha luogo fisiologicamente all'interno dell'ovidutto. Gli spermatozoi, una volta rilasciati, risalgono la tuba di Falloppio migrando verso la regione ampollare dove incontrano il complesso cumulo ooforo-ovocita ovulato ed in attesa di essere fecondato.

## **Diagnostica Seminale**

Dagli inizi del '900 si è cominciato a porre particolare attenzione alle caratteristiche morfologiche degli spermatozoi, da quando intorno agli anni '40 sono state identificate forme cellulari patologiche (Comhaire et al., 1988). L'osservazione delle caratteristiche morfofunzionali degli spermatozoi ebbe notevole rilevanza clinico-scientifica ai fini della valutazione della fertilità maschile aprendo la strada alla branca dell'andrologia che studia e valuta la qualità del liquido seminale: la seminologia. L'analisi del liquido seminale o spermiogramma è un'indagine di laboratorio di primo livello utile per identificare la potenzialità fecondante dell'uomo. È un esame specialistico che deve essere svolto da personale altamente specializzato in modo da ridurre l'eventuale soggettività della diagnosi, ed è quindi di fondamentale



importanza la standardizzazione delle procedure, in modo da avere osservazioni e risultati paragonabili. È per tale motivo che negli ultimi trent'anni sono state redatte a cura dell'OMS cinque edizioni del manuale dell'esame del liquido seminale, in cui sono elencate e discusse le norme di buona prassi necessarie per una corretta analisi.

Come in tutte le analisi di laboratorio anche per lo spermioγραμμα dobbiamo distinguere:

- la fase preanalitica;
- la fase analitica;
- la fase post-analitica;

Nella prima fase l'operatore deve accertarsi che il paziente abbia rispettato le buone norme di raccolta precedentemente comunicate, in modo da escludere le possibili variabili che potrebbero aver inficiato negativamente sulla valutazione dell'esame. Lo spermioγραμμα va eseguito dopo un'astinenza tra i 3 e i 7 giorni; un mancato rispetto del periodo può incidere negativamente sulla conta degli spermatozoi e sul volume del liquido seminale. L'unica modalità di raccolta è in un contenitore sterile da urinocoltura tramite masturbazione, solo in alcuni casi può essere consentita la raccolta in preservativi anatossici, è sempre consigliata la raccolta in una stanza vicina al laboratorio ma anche in questo caso può essere tollerata una raccolta non in sede solo se il campione viene consegnato entro 30 minuti avendo cura di non sottoporlo ad escursioni termiche durante il trasporto. Tutte le informazioni dal paziente devono essere registrate su un modulo di lavoro avendo cura di annotare oltre i

dati anagrafici, anche eventuali patologie, terapie farmacologiche o eventi febbrili nei tre mesi precedenti alla raccolta.

La seconda fase prevede l'indagine in cui si valuta effettivamente la qualità del liquido seminale e consta di due momenti: valutazione macro e microscopica.

Nella valutazione macroscopica si valutano i seguenti parametri:

Il *volume* dell'eiaculato è fondamentale sia per l'analisi della quantità di spermatozoi presenti sia perché volumi seminali ridotti possono essere un sintomo di ostruzione delle vie seminali o al contrario volumi seminali aumentati possono essere sintomo di infiammazioni. Il volume minimo è di 1.5 ml (5° percentile).

Il *PH* dovrebbe essere misurato dopo la fluidificazione attraverso cartine tornasole con range compreso tra 6 e 8. Esso è influenzato dal bilanciamento del secreto alcalino delle vescichette seminali e quello acido della prostata.

L'*aspetto* è valutato tramite la semplice osservazione visiva: un normale aspetto è avorio opalescente. Mediante questa prima valutazione si possono avere delle informazioni in merito alla componente cellulare; ricco di cellule se opalescente e scarso se acquoso; oppure la presenza di emazie può essere riconducibile a un colore rossastro mentre un colore bianco-giallastro può indicare la massiva presenza di leucociti.

La *fluidificazione* è valutata sia a livello microscopico che macroscopico, nel primo caso in un liquido non fluidificato si identifica una rete filamentosa in cui gli spermatozoi risultano intrappolati e immobili, nel

secondo caso si dovrebbe vedere un campione acquoso e senza coaguli; la fluidificazione può essere valutata facendo percolare il liquido seminale lungo le pareti di una provetta.

La *viscosità* invece è valutata facendo gocciolare il liquido seminale da una pipetta di circa 1.5 mm di diametro, e può essere considerata aumentata se le gocce sono sostituite da un unico filamento.

La valutazione microscopica inizia invece con l'allestimento dei preparati e viene eseguita con l'ausilio di un microscopio ottico per la valutazione della concentrazione, motilità e morfologia degli spermatozoi; si esegue su preparati a fresco non colorati, con ingrandimenti 10, 20, 40X.

La *concentrazione* è la conta del numero di cellule espresso per milioni/millilitro, diverso dalla conta totale degli spermatozoi che è invece la concentrazione di gameti nell'intero eiaculato. La camera di Makler è l'unica appositamente ideata per la conta degli spermatozoi. Il limite di riferimento per la concentrazione è di 15 milioni di spermatozoi per ml (5° percentile) e 39 milioni per eiaculato (5° percentile). Valori superiori a tali limiti stabiliscono una condizione di *normozoospermia*, valori inferiori indicano una condizione di *oligozoospermia*. In assenza di spermatozoi all'interno dell'eiaculato si potrebbe sospettare un'*azoospermia* da accertare però con una centrifugazione e analisi del pellet; se si rilevano pochi spermatozoi nel pellet si parlerà di *criptozoospermia*.

La *motilità* è necessaria affinché possa avvenire la fecondazione, e molti sono i fattori che la influenzano; per esempio la struttura del flagello, la presenza di ASA, patologie, stili di vita errati, ecc. Quando la percentuale

di spermatozoi mobili nello sperma è meno del 32% si parla di *astenozoospermia*. Nonostante l'avvento dei numerosi sistemi di analisi computerizzata l'osservazione diretta da parte dell'operatore rimane la diagnosi di motilità più utilizzata. Il movimento dello spermatozoo è di tipo flagellare e viene valutato classificandolo qualitativamente a seconda della direzione e della velocità di movimento.

È prevista una nomenclatura specifica della motilità:

- progressiva: si muove attivamente in modo lineare o non lineare, indipendentemente dalla velocità;
- non progressiva: sarebbero tutti i movimenti dello spermatozoo che non è però in grado di progredire nello spazio, ad esempio se descrive dei piccoli cerchi o se oscilla testa o coda rimanendo in situ;
- immobilità: nessun movimento.

I limiti stabiliti dal WHO 2010 per la motilità totale (progressiva e non) sono del 40% (5° percentile), per la motilità progressiva 32% (5° percentile).

In realtà l'alterazione della motilità è correlata a molti fenomeni di natura patologica tipo traumi, orchiti, varicocele, ed altro; nel caso di totale acinesia si può sospettare una patologia genetica come la sindrome di Kartagener (Mori et al., 2015).

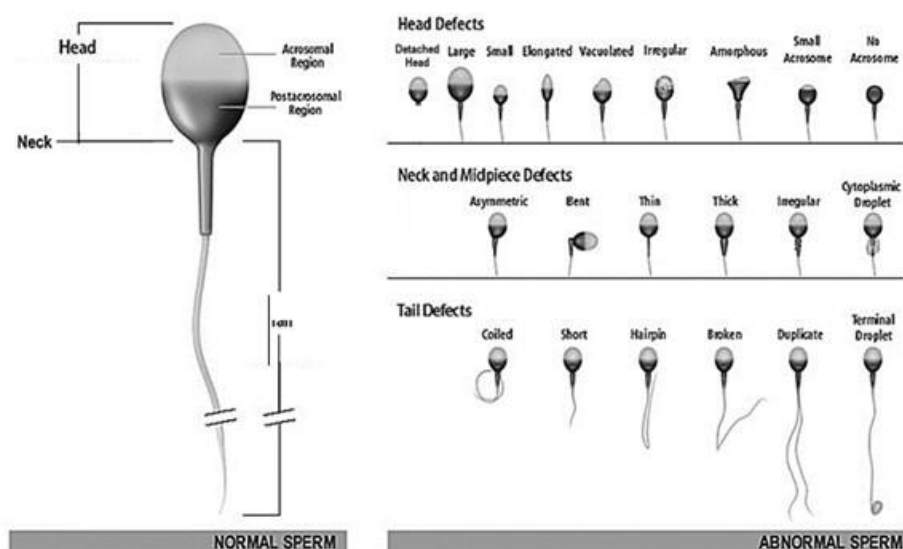
La valutazione *morfologica* distingue due categorie basate sull'osservazione dei tre domini che compongono lo spermatozoo (testa, tratto intermedio e coda): forme tipiche e atipiche.

Uno spermatozoo di forma tipica dovrebbe avere una testa liscia e ovale, rivestito per due terzi dal complesso acrosomiale. Tale struttura a forma di cappuccio ha una membrana interna a stretto contatto con la membrana nucleare e da una esterna posta al di sotto della membrana plasmatica. Si dovrebbe distinguere nettamente la zona acrosomiale che copre il 40-70% dell'area della testa, dove al suo interno si possono distinguere al massimo due vacuoli. Il collo invece è lungo 1  $\mu\text{m}$  e si estende nella parte posteriore della membrana nucleare fino al punto di unione della testa con il segmento intermedio della coda. La coda dovrebbe essere più sottile del tratto intermedio con un calibro uniforme su tutta la lunghezza.

Uno spermatozoo atipico può presentare diverse alterazioni:

- a livello della testa: microcefalia, macrocefalia, assenza di acrosoma, a punta o vacuolata, teste doppie;
- a livello del collo: collo angolato;
- a livello della coda: assente, doppia, mozza o rigonfia, angolata o inserzione asimmetrica.

Lo spermatozoo ha diverse forme ed è molto difficile distinguere qual è la forma normale da quella alterata. Gli spermatozoi inoltre sono cellule altamente specie-specifiche, e la nostra specie è quella che riconosce moltissime cellule immobili e atipiche; il limite inferiore per le forme normali è il 4% (5° percentile) al di sotto di tale limite si parla di teratozoospermia.



A sinistra uno spermatozoo dalla normale morfologia; a destra le possibili anomalie a livello di testa, collo e coda (<http://www.fssc.com.au/so-your-sperm-morphology-is-low-should-you-be-worried/>).

Nel liquido seminale si possono identificare anche componenti non spermatiche che possono essere: leucociti, emazie, elementi della linea germinativa, cellule di sfaldamento o zone di spermioagglutinazione. I leucociti rappresentano un segno di infiammazione delle ghiandole accessorie, le emazie sono invece sintomo di probabili microemorragie o patologie infiammatorie. Qualora dovessero essere osservate zone di spermioagglutinazione vanno segnalate come: rare, presenti o numerose; possono esserci agglutinzioni testa-testa o coda-coda oppure in forma mista aggregati a leucociti o ad altre cellule.

La terza e ultima fase, cioè quella post analitica prevede la refertazione dell'esame seminale. Deve essere stilato in maniera chiara, dove i valori relativi a concentrazione, morfologia e motilità sono confrontati con dei valori di riferimento riportati nell'ultimo WHO 2010. Tali valori derivano dalla selezione e retrospettiva di uomini fertili le cui partner hanno

concepito dopo dodici mesi dalla sospensione di metodi contraccettivi, di otto Paesi di tre continenti.

# PROCREAZIONE MEDICALMENTE ASSISTITA

## **Approccio alla Coppia Infertile**

Il primo colloquio con la coppia infertile deve essere approfondito per raccogliere l'anamnesi completa di entrambi i coniugi, valutare tutti gli esami già fatti ed eseguire un esame obiettivo di entrambi. Risulta utile ai fini diagnostici l'esecuzione a distanza di una settimana di almeno due esami del liquido seminale; è inoltre fondamentale stabilire la pervietà tubarica e la presenza di ovulazione. Non è sempre giusto prescrivere tanti esami diagnostici che sono molti e non sempre utili; ma è corretto stabilire quando e quali fare con criterio e in maniera graduale.

### 1. Esami anomali *strettamente* correlati con l'infertilità

- esame del liquido seminale
- isterosalpingografia o laparoscopia
- anovulazione

### 2. Esami anomali *non sempre correlati* con l'infertilità

- post-coital test
- endometriosi lieve (diagnosticata con laparoscopia)
- test di penetrazione del muco cervicale
- ricerca di anticorpi anti-spermatozoo
- isteroscopia



### 3. Esami anomali *non correlati* con l'infertilità

- biopsia dell'endometrio
- diagnosi varicocele
- falloppioscopia

Quella di ricorrere alla PMA per superare l'ostacolo dell'infertilità non è sicuramente una scelta facile, questo perché la difficoltà nell'avere figli è di per sé frustrante e deprimente per le coppie, inoltre dopo il percorso diagnostico avere un bambino con l'ausilio delle tecniche di fecondazione assistita è impegnativo e costoso sia sul piano emotivo che su quello economico (Spinapolice, 2014). La coppia deve essere disposta ad affrontare un faticoso iter diagnostico e terapeutico non sempre immediati e risolutivi.

I trattamenti di PMA sono possibili mediante una gamma di opzioni terapeutiche a diverso grado di invasività; nel nostro Paese sono state suddivise tenendo conto della loro complessità e necessità o meno di anestesia, in:

*-Tecniche di I livello:* inseminazione intrauterina (IUI);

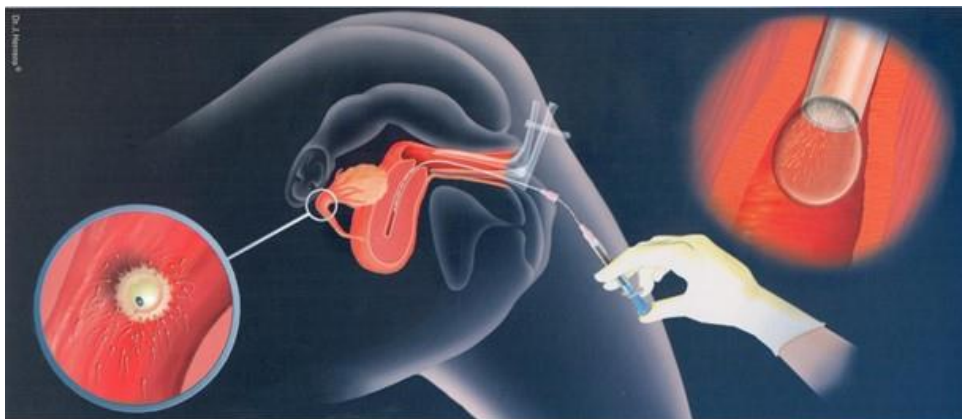
*-Tecniche di II livello:* fecondazione in vitro con trasferimento dell'embrione (FIVET) e iniezione intracitoplasmatica dello spermatozoo (ICSI);

*-Tecniche di III livello:* TESA (aspirazione degli spermatozoi dal testicolo), TESE (prelievo bioptico testicolare degli spermatozoi), PESA

(aspirazione percutanea degli spermatozoi dall'epididimo), MESA (aspirazione microchirurgica degli spermatozoi dall'epididimo).

La scelta dei diversi metodi viene effettuata sulla base del tipo di infertilità che affligge la coppia.

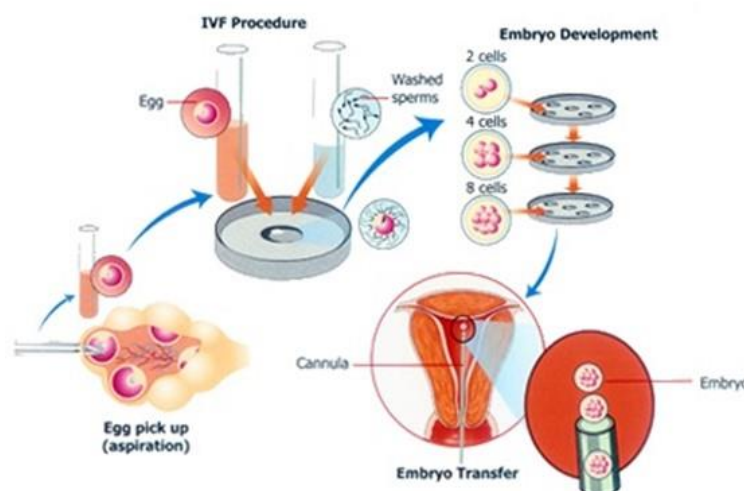
L'IUI viene utilizzata nel caso di disfunzioni ovulatorie, nei casi di infertilità sine causa, per infertilità maschile di grado lieve, muco cervicale ostile, endometriosi lieve o moderata o anche difficoltà nel rapporto sessuale (vaginismo). La tecnica prevede la scelta degli spermatozoi dotati di migliore vitalità; il seme (1-2 milioni di spermatozoi) viene raccolto dopo 2-4 giorni di astinenza, opportunamente lavorato e inserito per mezzo di un catetere mobile a livello del fondo dell'utero con la paziente in posizione ginecologica. L'ovulazione in questa tecnica può essere ottenuta nel corso di un ciclo spontaneo, quindi con lo sviluppo di un solo follicolo, oppure blandamente stimolato con gonadotropine al fine di produrre più ovociti per ogni trattamento; solitamente viene quindi eseguita l'IUI dopo 24-36 ore dalla somministrazione del farmaco. Le tecniche più utilizzate per la lavorazione del liquido seminale sono lo swim-up e l'uso di gradienti di densità. Le percentuali di successo sono del 10-15% a ciclo e, data la poca invasività del trattamento, può essere ripetuto più volte; perciò le possibilità di gravidanza mediante l'IUI salgono con l'aumentare dei tentativi.



**Tecniche di I livello:** inseminazione intrauterina (IUI) (<http://jolsana.it/intrauterine-insemination-iui>)

La FIVET è annoverata insieme alla ICSI tra le tecniche di elezione per i problemi di fertilità; messa a punto negli anni settanta dal fisiologo e Nobel per la medicina Robert Edwards e dal ginecologo Patrick Steptoe permise mediante la fecondazione extracorporea la nascita della prima bambina (Steptoe & Edwards, 1978). Con questa tecnica si sostituisce la funzione tubarica, perché essa prevede il recupero degli ovociti direttamente dall'ovaio (pick-up). La prima fase della FIVET prevede la stimolazione ovarica in modo da ottenere la crescita di più follicoli contemporaneamente; la crescita follicolare multipla consente di avere la possibilità di fecondare più ovociti con una percentuale di successo maggiore. Il pick-up viene eseguito dopo 33-36 ore dalla somministrazione della gonadotropina corionica umana; inizialmente il prelievo avveniva per via laparoscopica in anestesia generale, successivamente la tecnica è stata modificata e perfezionata con il prelievo dei gameti per via transvaginale sotto controllo ecografico in anestesia locale o lieve sedazione. Viene inserita nella paziente una sonda e tramite un ago fatto penetrare attraverso la parete vaginale vengono aspirati i follicoli: gli ovociti prelevati sono

circondati dalle cellule follicolari e, una volta *in vitro*, vengono esaminati sotto uno invertoscopio per valutarne lo stadio di maturazione. Per essere fecondato l'ovocita deve trovarsi in una precisa fase di maturazione: la *metafase II*; quelli immaturi vengono incubati per circa 12 ore al fine di permettere il completamento della maturazione *in vitro*; al contrario, gli ovociti post-maturi sono inutilizzabili se luteinizzati. Una volta prelevati gli ovociti si chiede al partner di raccogliere il liquido seminale, e gli spermatozoi ottenuti verranno selezionati mediante due metodologie: swim-up o gradiente di densità; il primo permetterà la migrazione delle cellule nemespermiche con una vitalità migliore a livello dell'interfaccia tra pellet e sovrantante mentre il secondo si basa sulla selezione passiva degli spermatozoi mediante due gradienti di densità diversi. A questo punto gli ovociti recuperati vengono messi a contatto con 100.000-300.000 spermatozoi all'interno di un terreno di coltura; come dimostrano Trounson et al., 2001 lo spermatozoo ci impiegherà circa due ore per penetrare l'ovocita.

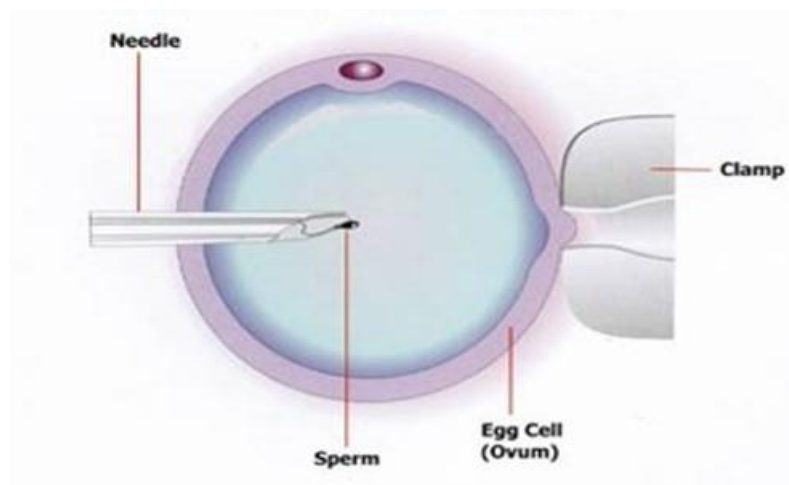


**Tecniche di II livello:** fecondazione in vitro (FIVET) (<https://sarvamangalivf.com/ivf-procedure/>).

La ICSI è una tecnica introdotta negli anni '90, che ha consentito di trattare coppie con un fattore di sterilità maschile particolarmente grave. Questa tecnica è stata descritta nel 1988 da Lanzendorf et al., ma solo nel 1992 si è ottenuta la prima gravidanza (Palermo et al., 1992). Tale tecnica consente di introdurre direttamente all'interno del citoplasma dell'ovocita un singolo spermatozoo. Possono essere trattate con questa procedura le coppie il cui partner maschile presenta pochi spermatozoi e/o anche scarsamente vitali. Inoltre è consigliabile la ICSI in caso di patologie femminili come l'endometriosi di III e IV stadio, sindrome dell'ovaio policistico oppure mancata fecondazione in precedenti cicli di FIVET o in seguito a preservazione della fertilità in caso di cancro.

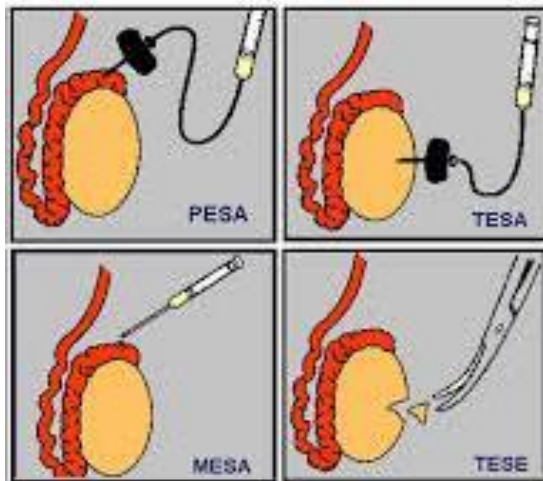
Gli ovociti maturi che vengono prelevati dopo essere sottoposti a lavaggio sono posti in terreno di coltura con albumina in attesa di essere inseminati, mentre quelli immaturi vengono lasciati in incubatore fino all'estrusione del primo corpo polare e, arrivati alla metafase II, saranno pronti anch'essi per la microiniezione dello spermatozoo. L'inseminazione mediante ICSI prevede sempre una decumulazione tramite sistemi enzimatici (ialuronidasi) o meccanici; successivamente, selezionati gli spermatozoi con una buona motilità, morfologia e vitalità si può procedere alla iniezione mediante un micromanipolatore. Dopo l'inseminazione, in prima giornata si osserva la comparsa di due pronulcei, in seconda e terza giornata gli embrioni si trovano tra le due e le otto cellule, tra la quinta e la sesta gli embrioni migliori arrivano a blastocisti. L'embrione pronto per il transfer viene caricato in un catetere; prelevato con una piccola quantità di

terreno di coltura e intrappolato tra due bolle d'aria viene trasferito nella cavità uterina. Al termine di tale procedura sarà fondamentale controllare che il catetere risulti vuoto.



**Tecniche di II livello:** iniezione intracitoplasmatica ICSI (<http://medical.miragesearch.com/treatment/ivf-infertility/intracytoplasmic-sperm-injection-icsi>).

Nei casi in cui non siano evidenziabili spermatozoi nel liquido seminale si interviene mediante le tecniche di III livello, cioè tecniche chirurgiche secondo le quali si recuperano spermatozoi direttamente dall'epididimo nel caso della MESA e PESA; nel caso della TESA il prelievo viene fatto attraverso la cute del testicolo, mentre la TESE consente di recuperare spermatozoi direttamente da un piccolo frammento di tessuto del testicolo asportato chirurgicamente.



**Tecniche di III livello:** PESA, TESA, MESA, TESE  
[http://www.lowcostivf.net/surgical-sperm-retrieval-tesa-mesa.html#.V\\_9BnfmLSUk](http://www.lowcostivf.net/surgical-sperm-retrieval-tesa-mesa.html#.V_9BnfmLSUk).

# PRESERVAZIONE DELLA FERTILITÀ

## **Criobiologia: Crioconservazione dei Gameti e Crioprotettori**

La crioconservazione di spermatozoi, ovociti, tessuto testicolare e tessuto ovarico ha acquisito un ruolo fondamentale nella PMA. Con l'entrata in vigore della legge 40/2004 che vietava il congelamento degli embrioni era particolarmente utilizzata nella crioconservazione ovocitaria permettendo un'unica stimolazione ovarica e il congelamento di eventuali ovociti sovranumerari; solo nel maggio del 2009 la Corte Costituzionale con la sentenza 151 ha reintrodotto la possibilità di congelare anche gli embrioni. È particolarmente utile per le pazienti a rischio di OHSS (sindrome da iperstimolazione ovarica), infatti circa un quarto delle donne che si sottopongono alla fecondazione assistita evidenziano una forma lieve di OHSS che scompare dopo circa una settimana; una piccola percentuale di donne invece sviluppa una forma più grave di questa sindrome che causa dolore e gonfiore addominale, nausea, vomito, diarrea, mancanza di fiato ecc. Per evitare l'insorgenza di tale risposta ovarica e ridurre l'incidenza esistono diversi metodi ma non è possibile effettuare una prevenzione di assoluta efficacia; l'unica alternativa è sospendere il ciclo di stimolazione rinviando il trattamento, congelare gli ovociti e utilizzarli in un ciclo differito.

Le tecniche di crioconservazione consentono di mantenere cellule e tessuti in uno stato vitale utilizzando il congelamento in azoto liquido a -196 °C.



L'esposizione a temperature così basse induce però diversi danni a livello intra ed extra cellulare, provocando riduzione nelle attività enzimatiche e nei meccanismi di trasporto di membrana con conseguente perdita di ioni; inoltre la formazione di cristalli di ghiaccio provoca all'esterno della cellula un richiamo d'acqua, e quindi disidratazione cellulare e riduzione del volume citoplasmatico. La formazione di cristalli all'interno del citoplasma al momento dello scongelamento provoca invece danni meccanici agli organelli cellulari e alla membrana plasmatica.

Attualmente la crioconservazione è applicabile attraverso due metodologie: congelamento lento/scongelamento rapido e vitrificazione/riscaldamento. La sostanziale differenza tra i due approcci sta nella velocità con cui si passa da una temperatura fisiologica ai  $-196^{\circ}\text{C}$  dell'azoto liquido. Il primo metodo tende a prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare tramite un lento abbassamento della temperatura: in tal modo la cristallizzazione che avviene all'esterno della cellula dovrebbe non disturbare l'ambiente intracellulare; il secondo invece mira ad evitare la formazione di ghiaccio intracellulare attraverso un istantaneo abbassamento della temperatura facendo in modo che il tempo richiesto per la transizione termica non sia tale da permettere il passaggio di stato. Ad oggi solo pochi autori hanno riportato studi comparativi tra i due metodi di congelamento; Fadini et al., 2009 hanno riportato che vi è una migliore sopravvivenza degli ovociti, una migliore fertilizzazione e successivo sviluppo della blastocisti negli ovociti vitrificati; Chian & Cao, 2009, confrontando ovociti sottoposti a vitrificazione e a congelamento

lento osservarono nei primi un migliore avanzamento a blastocisti e meno anomalie genetiche, ma non evidenziarono invece differenze nel tasso di fecondazione. Bianchi et al., 2014 hanno invece analizzato le caratteristiche *ultrastrutturali* di ovociti crioconservati affermando che la forma, le dimensioni, l'integrità della zona pellucida, numero e disposizione dei microvilli erano tutte paragonabili a ovociti freschi. Alcune differenze sono state invece trovate nell'assetto citoplasmatico: i granuli corticali risultavano diminuiti nel numero e nell'elettrodensità in entrambi i metodi di congelamento, gli aggregati mitocondri-reticolo endoplasmico (M-SER) e i complessi mitocondri-vescicole (M-V) diminuivano più del 50% nei vitrificati mentre non subivano modifiche evidenti nel congelamento lento, viceversa risultava una maggiore vacuolizzazione in questi ultimi rispetto a quelli vitrificati.

Per crioconservare con successo limitando il danno intracellulare si utilizzano delle sostanze dette *crioprotettori*, cioè agenti che hanno il compito di proteggere le cellule dal danno criogenico. Il glicerolo è il primo composto organico ad essere stato usato nella pratica di laboratorio, sostituito in seguito da ethylene glicol, acetamide ma soprattutto propanediolo (PrOH) e dimetilsolfossido (DMSO). Essi si dividono in due categorie: penetranti (DMSO, glicerolo, PrOH, ethylene glicol) e non penetranti (zuccheri, amido, lipoproteine, polivinilpirrolidone); i crioprotettori esercitano effetti differenti sui campioni biologici: in primo luogo disidratano la cellula riducendo la quantità d'acqua che potrebbe trasformarsi in ghiaccio, si sostituiscono all'acqua intracellulare

convertendo il citoplasma in un ambiente amorfo, abbassano poi il punto di congelamento occupando mediante legami ad idrogeno le molecole d'acqua interferendo perciò con il processo di cristallizzazione. L'efficacia del crioprotettore dipende dalla capacità di attraversare la membrana cellulare, cioè se questo accade con difficoltà la perdita d'acqua durante la disidratazione sarà più veloce di quanto il crioprotettore riesca ad entrare nella cellula creando una sorta di contrazione e repentino aumento di volume stressogeno per la cellula stessa. È solito infatti trattare i gameti da crioconservare a concentrazioni di crioprotettore crescenti in modo che le variazioni di volume siano graduali e rispettino i limiti tollerati. Un altro fattore che influenza pesantemente la cellula crioconservata è la tossicità.

## **Oncofertilità**

Attualmente la crioconservazione è fondamentale nei pazienti affetti da neoplasie, tenendo presente che circa il 3% dei tumori maligni viene diagnosticato a pazienti con età inferiore ai 40 anni, va da sé che la possibile comparsa di sterilità in seguito a trattamenti antiproliferativi risulti non di poca importanza e influenzi pesantemente non solo il disagio psicologico che già affligge questi pazienti ma anche la loro prognosi; la crioconservazione dei gameti permette dunque di affrontare meglio la diagnosi e il trattamento del cancro con la reale garanzia di un futuro. (Domingo & Garcia-Velasco, 2016)

È ormai noto che la radioterapia e la chemioterapia siano trattamenti ad alto rischio infertilità, quanto severa dipende dalla posologia del farmaco antitumorale impiegato, dall'estensione e sede del campo, dose e frazionamento, età e sesso del/la paziente.

GRADO DEL RISCHIO	TRATTAMENTO
Rischio elevato (> 80%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Trapianto di cellule staminali ematopoietiche con ciclofosfamide/irradiazione corporea totale o con ciclofosfamide/busulfano.</li> <li>-Radioterapia esterna che includa nel campo d'irradiazione le ovaie.</li> <li>-CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna con età &gt; 40 anni.</li> </ul>
Rischio intermedio	<ul style="list-style-type: none"> <li>-CMF, CAF, CEF, per 6 cicli in una donna tra 30 e 39 anni.</li> <li>-AC, per 4 cicli in una donna con età ≥ 40 anni.</li> </ul>
Rischio basso (< 20%)	<ul style="list-style-type: none"> <li>-ABVD (doxorubicina/bleomicina/vinblastina/dacarbazina).</li> <li>-CHOP per 4-6 cicli (ciclofosfanide/doxorubicina/vincristina/prednisone).</li> <li>-CVP (ciclofosfamide/vincristina/prednisone).</li> <li>-AML (antraciline/citarabina).</li> <li>-ALL (polichemioterapia).</li> <li>-CMF, CAF, CEF, 6 cicli in una donna con età &lt; 30 anni.</li> <li>-AC 4 cicli in una donna di età &lt; 40 anni.</li> </ul>
Rischio molto basso o assente	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Vincristina.</li> <li>-Metotrexate.</li> <li>-Fluorouracile.</li> </ul>
Rischio sconosciuto	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Taxani.</li> <li>-Oxaliplatino.</li> <li>-Irinotecan.</li> <li>-Anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab).</li> <li>-Inibitori delle tirosino-chinasi (erlotinib, imatinib).</li> </ul>

Lee S et al: *ASCO recommendations on fertility preservation in cancer patients*, J. Clin. Oncol. 2006<sup>3</sup>

Rischio di amenorrea permanente nelle donne trattate con chemioterapia e radioterapia (AIOM).

AGENTI (DOSE CUMULATIVA PER AVERE L'EFFETTO)	EFFETTO
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Radiazioni (2.5 Gy al testicolo)</li> <li>-Clorambucil (1.4 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Ciclofosfamide (19 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Procarbazina (4 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Melfalan (140 mg/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Cisplatino (500 mg/m<sup>2</sup>)</li> </ul>	Azoospermia prolungata
<ul style="list-style-type: none"> <li>-BCNU (carmustina) (1 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-CCNU (lomustina) (500 mg/m<sup>2</sup>)</li> </ul>	Azoospermia nell'età adulta dopo trattamento in età prepuberale
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Busulfano (600 mg/kg)</li> <li>-Ifosfamide (42 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-BCNU (300 mg/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Mostarde azotate</li> <li>-Actinomomicina D</li> </ul>	Azoospermia probabile, in genere data da altri agenti altamente sterilizzanti associati
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Carboplatino (2 g/m<sup>2</sup>)</li> </ul>	Azoospermia prolungata non sempre osservata a questa dose
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Doxorubicina (adriamicina) (770 mg/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Tiotepa (400 mg/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Citosina arabinoside (1 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Vinblastina (50 g/m<sup>2</sup>)</li> <li>-Vincristina (8 g/m<sup>2</sup>)</li> </ul>	Tossicità additiva con i farmaci sopra nel determinare una azoospermia prolungata; se non combinati con i farmaci sopra, causano solo una riduzione temporanea della conta spermatica
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Amsacrina, bleomicina, dacarbazina, daunorubicina, epirubicina, etoposide, fludarabina, fluorouracile, 6-mercaptopurina, metotrexate, mitoxantrone, tioguanina</li> </ul>	Riduzione temporanea nella conta spermatica alla dose usata negli schemi convenzionali, ma sono possibili effetti additivi
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Prednisone</li> </ul>	Improbabile che riduca la produzione spermatica
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Interferone alfa</li> </ul>	Nessun effetto sulla produzione spermatica
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Nuovi agenti: oxaliplatino, irinotecan, anticorpi monoclonali (trastuzumab, bevacizumab, cetuximab), inibitori delle tirosino chinasi (erlotinib, imatinib), taxani</li> </ul>	Rischi sconosciuti sulla produzione spermatica

Effetto dei differenti agenti antitumorali sulla produzione dello sperma nell'uomo (AIOM).

I pazienti che crioconservano il seme sono affetti in particolare da tumori testicolari e linfomi (Hodgkin e non Hodgkin), che sono di fatto i tumori che colpiscono maggiormente maschi in età fertile. Nonostante questa forte incidenza è consigliabile il deposito del seme anche in altre patologie tumorali, degenerative o autoimmuni. Essa si effettua mediante due procedimenti che prevedono un congelamento lento o rapido. Il primo si avvale di apparecchiature automatiche che portano gradualmente le cellule dalla temperatura ambiente a  $-196^{\circ}\text{C}$  in maniera controllata, il secondo invece viene utilizzato per congelare gli spermatozoi e non richiede l'ausilio di apparecchiature.

### **Social Freezing**

Un altro aspetto della crioconservazione è il *social freezing*, cioè il congelamento degli ovociti a scopo sociale; donne che per motivi di carriera o in attesa di una relazione stabile rinviando il momento della maternità hanno la possibilità di congelare la propria fertilità. Si può fare entro i 38 anni, non oltre perché la qualità ovocitaria diminuisce con l'avanzare dell'età, oggi è una strada percorribile soprattutto per chi sceglie di posticipare la maternità; la necessità di una stabilità economica o le problematiche relazionali fanno sì che la maternità si sposti in una fascia d'età biologicamente troppo avanzata. Il tasso medio di sopravvivenza dei gameti risulta del 70%, cala però la percentuale se si va a vedere il tasso di

gravidanza rispetto all'utilizzo di ovociti non congelati (Argyle et al., 2016).



## SCOPO DELLA TESI

Uno dei problemi legati alla crioconservazione del liquido seminale è la riduzione dei parametri vitali come la vitalità, la motilità e modificazioni della normale morfologia della componente nemaspermica. Nonostante i numerosi lavori scientifici pubblicati in merito, non si sa ancora bene quale sia il metodo di crioconservazione migliore per il mantenimento dell'integrità cellulare; sono necessari quindi ulteriori studi volti ad identificare la metodologia migliore di crioconservazione. Nawroth et al. 2002 per esempio hanno dimostrato la possibilità di vitrificare senza utilizzare alcun crioprotettore, inserendo cioè la sospensione di spermatozoi direttamente nell'azoto liquido; questa tecnica evita l'uso del crioprotettore e quindi la sua tossicità e pericolosità a livello di stress osmotico per le cellule, non solo, è anche in grado di prevenire la formazione di ghiaccio intracellulare e il dannoso effetto di alte concentrazioni di sali durante congelamento e scongelamento (Isachenko et al., 2003). Un altro studio ha paragonato gli effetti della fase liquida e della fase gassosa della procedura durante la crioconservazione degli spermatozoi condotta utilizzando il cryoloop come supporto. I risultati suggeriscono che la preservazione senza il crioprotettore è possibile utilizzando un ampio spettro di velocità di raffreddamento (Isachenko et al., 2004b). Inoltre è stato dimostrato che l'uso del saccarosio come crioprotettore non permeabile ha migliorato il tasso di motilità e l'attività mitocondriale degli spermatozoi in seguito a vitrificazione (Isachenko et al., 2008). A tal proposito Agha Rahimi et al., 2014 hanno recentemente



dimostrato come la vitrificazione di spermatozoi in assenza di crioprotettore abbia dato risultati simili a quelli ottenuti applicando il congelamento rapido con due vantaggi, assenza di tossicità e diminuzione di danni a livello del DNA. Isachenko et al., 2011 e 2012 hanno inoltre osservato come spermatozoi vitrificati senza alcuna crioprotezione possono essere immediatamente utilizzati dopo lo scongelamento senza alcun ulteriore trattamento, riportando la nascita di un bambino sano dopo IUI in seguito a swim-up di spermatozoi vitrificati.

Una questione controversa nel campo della crioconservazione dei gameti è circa la presenza o assenza del liquido seminale durante la crioconservazione degli spermatozoi. Il potenziale protettivo del liquido seminale è stato confermato dalla presenza in esso di ioni come zinco e di antiossidanti (Donnelly et al., 2001; Saritha & Bongso et al., 2001); esso può però contenere alti livelli di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Aitken & Clarkson, 1988). Perciò, vitrificare un eiaculato puro può avere svariati effetti sui parametri nemaspermici, particolarmente se si tratta di spermatozoi anomali (Khalili et al., 2014); pertanto la preparazione dello sperma dovrebbe prevedere la selezione degli spermatozoi migliori, impedendo la produzione di ROS da spermatozoi morti o danneggiati.

Lo scopo di questa tesi è stato quello di testare gli effetti di un medium di coltura artificiale simile nella composizione al liquido seminale ma privo degli effetti collaterali negativi e valutare il suo effetto sugli spermatozoi umani andando ad analizzare una serie di parametri prima e dopo la

vittrificazione. In particolare mediante analisi microscopica sono stati valutati motilità, vitalità, morfologia e ultrastruttura.

# MATERIALI E METODI

Il presente studio è stato condotto nell'ambito di una collaborazione internazionale tra il Laboratorio di Microscopia Elettronica "Pietro M. Motta" della Sapienza Università di Roma e l'Università di Yazd, Iran.

Per realizzare questo progetto in seguito a consenso informato dei pazienti, sono stati selezionati 30 campioni di liquido seminale all'interno del Laboratorio di Andrologia del "Research and Clinical Center for Infertility", Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

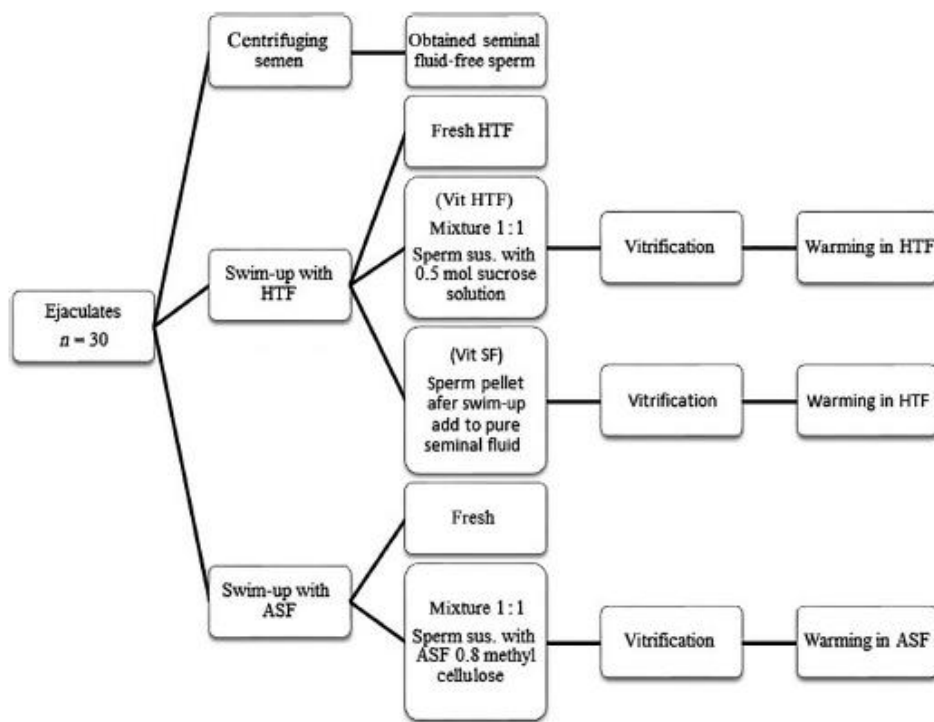
Ogni campione è stato suddiviso in 3 porzioni:

1. La prima porzione è stata centrifugata a 2000 *g* e privata del pellet per ottenere plasma seminale, liquido seminale privo della componente nemaspermica.
2. Nella seconda porzione di liquido seminale gli spermatozoi sono stati sottoposti a swim-up in fluido tubarico umano (HTF: human tubal fluid). La sospensione di spermatozoi raccolta è stata suddivisa ulteriormente in tre parti: *a*, *b*, *c*. La prima parte di spermatozoi (*a*) verrà considerata come controllo o come spermatozoi "a fresco" (Fresh HTF); nella seconda parte invece (*b*) gli spermatozoi dopo swim-up in HTF sono stati arricchiti con una soluzione 0.5M di saccarosio (1:1) e sottoposti a vitrificazione (Vit HTF: vitrification in human tubal fluid) secondo la procedura

descritta da Isachenko et al., 2008; infine la terza parte (c) è stata prima centrifugata e, recuperato il pellet, esso è stato arricchito con semplice liquido seminale (SF: seminal fluid). Lo scongelamento in questi due crio-gruppi è stato eseguito in HTF privo di saccarosio. Il mezzo HTF in tutte le fasi è stato integrato con 5mg/mL di albumina.

3. Nella terza porzione gli spermatozoi sono stati sottoposti a swim-up in liquido seminale artificiale (ASF: artificial seminal fluid). La sospensione di spermatozoi raccolta è stata mescolata (1:1) con ASF contenente 0.8% di metilcellulosa e sottoposto a vitrificazione (Vit ASF: vitrification in artificial seminal fluid); il successivo scongelamento è stato eseguito in ASF senza la metilcellulosa.

Sono stati ottenuti così 5 gruppi: *HTF a fresco*, *ASF a fresco*, *Vit HTF*, *Vit SF*, *Vit ASF*. Dopo vitrificazione e scongelamento tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi seminale mediante l'utilizzo della Microscopia Ottica. Successivamente sono stati trattati per l'analisi ultrastrutturale mediante l'uso della Microscopia Elettronica a Trasmissione (MET) secondo i protocolli descritti da Agha Rahimi et al., 2016, Gandini et al. 2000 e Sathananthan, 1996.



Rappresentazione schematica del trattamento dei campioni e la successiva classificazione

## Liquido Seminale Artificiale

Nel nostro studio la formulazione dell'ASF si è ispirata, seppur con alcune modifiche, ad un precedente studio di Owen e Katz, 2005 nel quale erano già state descritte le proprietà fisiche e chimiche di un liquido seminale artificiale che mimasse le caratteristiche dell'ejaculato fisiologico.

L'ASF è stato perciò creato anche in base ad un'analisi delle concentrazioni di ioni all'interno del liquido seminale umano.

Esso è composto da: NaCl: 2.69g/L, Na citrato diidrato: 8.13 g/L, KCl: 0.432 g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 1.91 g/L, Na piruvato: 0.374 g/L, Na lattato 0.779 g/L, glucosio: 1.12 g/L, fruttosio: 2.72 g/L, NaHCO<sub>3</sub>: 2.1 g/L, urea: 0.72 g/L, urato: 0.07 g/L, acido ascorbico: 0.1 g/L, MgSO<sub>4</sub>: 0.54 g/L, ZnSO<sub>4</sub> 7

H<sub>2</sub>O: 0.5 g/L, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O: 0.73 g/L, albumina sierica umana: 11g/L, gentamicina: 40 mg/L.

La viscosità del mezzo è stata ottenuta mediante l'aggiunta della metilcellulosa che non ha però alterato l'osmolarità del mezzo, permettendo una vitrificazione in condizione isosmotica.

I componenti chimici di entrambi i mezzi di coltura ASF e HTF sono presentati nella tabella 1.

Fruttosio, citrato, Zn, urea, urato e acido ascorbico sono presenti esclusivamente in ASF; Mg, Ca, Na, glucosio e piruvato sono invece presenti in entrambi i mezzi di coltura (ASF e HTF), ma sono maggiormente rappresentati in ASF.

Tutti i materiali utilizzati sono stati acquistati dalla Sigma (St. Louis, MO, USA).

## **Vitrificazione e Scongellamento**

La vitrificazione e lo scongelamento sono stati eseguiti secondo quanto scritto da Isashenko et al., 2008.

Per il congelamento i campioni sono stati divisi in aliquote da 25 µl e utilizzando una micropipetta sono stati immersi in azoto liquido all'interno di uno strainer preraffreddato. Le sfere solide ottenute, sono state confezionate all'interno di cryotubes e conservate a -196 °C per 24 h.

Per lo scongelamento le sfere sono state immerse molto rapidamente in 5 ml di mezzo di coltura preriscaldato a 37 °C e sottoposte a blanda agitazione per 5-10 secondi.

Terminato lo scongelamento la sospensione di spermatozoi è stata sottoposta a centrifugazione a 400 g per 5 minuti e gli spermatozoi sono stati mantenuti a 37 °C/5% CO<sub>2</sub> per 30 minuti prima di cominciare l'analisi seminale.

### **Analisi Seminale**

L'analisi seminale è stata eseguita secondo le linee guida del WHO 2010; Per lo studio della *motilità*, con l'ausilio di una micropipetta un volume fisso di 10 µl di sospensione è stato posto su un vetrino portaoggetti e successivamente coperto da un vetrino coprioggetto. È necessario, ai fini di una buona analisi, osservare almeno 5 campi in modo sistematico per classificare 200 spermatozoi. La motilità di ogni spermatozoo è definita di grado A, B, C, o D. Nel grado A gli spermatozoi si muovono in maniera progressiva, quindi più velocemente e dritti, nel grado B gli spermatozoi hanno una motilità non lineare, si muovono in avanti ma in modo sinuoso, nel grado C hanno una motilità non progressiva perché non avanzano nonostante il movimento della coda, l'ultimo, il grado D è il più grave tra tutti, perché gli spermatozoi sono privi di qualunque motilità e spostamento.

Nel nostro studio abbiamo considerato solo gli spermatozoi di grado A e B e il numero di spermatozoi di ogni categoria è stato registrato su un contacellule.

Per l'osservazione della *morfologia* degli spermatozoi la colorazione di Papanicolau è quella più diffusa nei laboratori di andrologia perché essa fornisce una buona colorazione della regione acrosomiale e di quella post acrosomiale della testa, residui citoplasmatici, tratto intermedio e flagello. La testa si colora di blu chiaro nella regione acrosomiale e blu scuro nella regione post-acrosomiale, il tratto intermedio può assumere una colorazione rossastra mentre la coda anch'essa si colora di rosso o di blu. Sono stati osservati 200 spermatozoi e per ottenere una semplice categorizzazione abbiamo diviso gli spermatozoi in 4 gruppi in base alla componente anatomica alterata: normali; alterazioni della testa; alterazioni del tratto intermedio e della coda; alterazioni della testa, del tratto intermedio e della coda.

L'ultimo parametro che abbiamo analizzato è la *vitalità*, descritta come percentuale di cellule vive e determinata dal test eosina-nigrosina. Tale tecnica si basa sul principio che le cellule morte, avendo la membrana plasmatica danneggiata, fanno passare determinati coloranti che normalmente non permeano la membrana, quindi al microscopio a contrasto di fase è possibile differenziare gli spermatozoi vivi (non colorati) da quelli morti (colorati). Anche in questo caso la valutazione è stata effettuata su 200 spermatozoi.



## **Microscopia Elettronica**

I campioni a questo punto sono stati trattati per la MET. Sono stati prima fissati in glutaraldeide 2.5% e post-fissati in tetrossido di osmio all'1%. Per avere una sospensione di spermatozoi compatta e facile da maneggiare durante la procedura di inclusione in resina, il pellet, ormai fissato, è stato trasferito in agar 1%, successivamente disidratato con alcool a concentrazioni crescenti, sostituito in seguito con ossido di propilene per permettere una buona infiltrazione del mezzo di inclusione. A questo punto i campioni immersi in resina pura sono stati posti in stufa, dove l'alta temperatura consentirà la polimerizzazione e l'indurimento dei blocchetti. Solo dopo 48 h i campioni pronti per l'ultramicrotomia sono stati tagliati in modo da ottenere sezioni ultrasottili di circa 600-900 nm, recuperate con retini di rame e successivamente contrastate con citrato di piombo. Le sezioni sono state infine osservate al microscopio elettronico a trasmissione Zeiss EM10 ad un voltaggio di 80kV. Le immagini sono state acquisite mediante l'utilizzo una telecamera (Gatan CCD) posta al di sotto dello schermo a fluorescenza. La valutazione ultrastrutturale è stata eseguita secondo le linee guida di Satanathan, 1996.

## **Analisi Statistica**

Abbiamo effettuato il *t*-test per comparare i parametri nemaspermici prima e dopo la vitrificazione; la comparazione dei dati è stata eseguita mediante il test ANOVA-Tukey.

Per valutare i dati con una distribuzione anomala è stato utilizzato il test di Kruskal-Wallis.

Una differenza significativa tra i gruppi è stata identificata solo con valori di  $p\text{-value} < 0.05$ .

# RISULTATI

## **Comparazione dei Parametri Nemaspermici tra i Gruppi a Fresco e i Vitrificati**

Nei gruppi a fresco HTF e ASF, tutti i parametri nemaspermici sono risultati simili e paragonabili. Invece, come era prevedibile, i parametri relativi alla morfologia normale, motilità e vitalità sono apparsi significativamente ridotte nei gruppi vitrificati rispetto a quelli a fresco ( $p<0.001$ ).

Andando a paragonare i parametri in condizioni di vitrificazione diverse invece, la motilità progressiva, la vitalità e la normale morfologia sono significativamente più alte in Vit ASF rispetto a Vit HTF, mentre tutti i parametri risultano in generale migliori in Vit ASF rispetto a Vit SF ma solo la vitalità sembra differire in maniera significativa ( $p=0.006$ ). Anche la motilità di grado A è risultata maggiormente rappresentata in Vit ASF e Vit SF ( $36.59\pm11.40$  e  $31.13\pm15.38$ ) rispetto al gruppo Vit HTF ( $16.41\pm11.24$ ) ( $p<0.001$ ) (tabella 2).

Dopo il congelamento anche le caratteristiche morfologiche alterate sono cambiate; nei campioni a fresco, infatti, la categoria di alterazioni morfologiche più rappresentata era a livello delle teste. In tutti i gruppi vitrificati invece, si riduceva l'incidenza di questa anomalia ma c'era un incremento significativo di difetti a livello di code e teste; questo dato era particolarmente evidente in Vit HTF e Vit SF rispetto a Vit ASF.

## **Tassi di Recupero dei Parametri Vitali Post Scongellamento**

I risultati dei tassi di recupero dei parametri vitali post scongelamento sono stati riportati in tabella 3.

Tali valori sono stati ottenuti calcolando i parametri nemaspermici prima della vitrificazione/parametri nemaspermici allo scongelamento x 100.

I tassi di recupero di vitalità e della normale morfologia erano significativamente maggiori nel gruppo Vit ASF rispetto a Vit SF e Vit HTF ( $p<0.05$ ). I tassi di recupero della motilità progressiva e della normale morfologia erano significativamente maggiori nel gruppo Vit ASF rispetto a Vit HTF ( $p=0.03$ ).

## **Analisi Morfologica ed Ultrastrutturale**

Analizzando le immagini scattate al microscopio elettronico a trasmissione degli spermatozoi a fresco e vitrificati, i campioni a fresco hanno mostrato membrana plasmatica intatta e normali acrosomi (Fig. 1a-3b)

Nei campioni non vitrificati l'acrosoma è apparso denso, omogeneo e intatto; il nucleo appariva condensato senza grandi vacuoli (Fig. 1a e 1b). Talvolta a livello della testa sono stati osservati piccoli vacuoli e in posizione centrale strutture membranose sotto forma di inclusioni nucleari (Fig. 2a e 2b). Nella regione del collo i mitocondri sono apparsi arrangiati

in maniera irregolare, provvisti di numerose creste e con uno spazio intermembrana ridotto (Fig. 3a e 3b).

Nonostante si sia notata una migliore preservazione nel gruppo Vit ASF sono stati osservati diversi tipi di danno in tutti i gruppi vitrificati, nei quali l'acrosoma è risultata la parte anatomica più sensibile al crio-danno; l'analisi al MET infatti ha identificato una perdita parziale o completa dell'acrosoma, spesso rigonfio o vescicolato, con un contenuto eterogeneo e con rigonfiamenti sub-acrosomiali. La membrana plasmatica ha mostrato molti difetti dopo lo scongelamento come rigonfiamento, rotture, raggrinzimenti. Sono state inoltre osservate aree del tutto prive di membrana. Nei nuclei dei vitrificati è stata osservata una minore elettrodensità rispetto ai controlli a fresco e sono state osservate inclusioni granulari, voluminosi vacuoli apparentemente vuoti e non delimitati da membrana posizionati solitamente al centro del nucleo. I mitocondri sono apparsi tondi con creste poco definite e visibili.

In particolare, nel gruppo Vit ASF (Fig. 4a-6) sono stati osservati acrosomi approssimativamente intatti come anche la cromatina (Fig. 4a e 4b); in alcuni casi l'acrosoma aveva una membrana plasmatica particolarmente reattiva; si osservava inoltre una cromatina leggermente granulare e perdita della membrana plasmatica (Fig. 5); a livello del tratto intermedio sono stati inoltre osservati mitocondri rigonfi con creste dilatate e non particolarmente nitide (Fig. 6).

Nel gruppo Vit HTF (Fig. 7-10) è stato osservato a livello acrosomiale un rigonfiamento, perdita della membrana nella regione del collo e cromatina decondensata nel nucleo (Fig. 7). Sono stati osservati anche casi di cellule necrotiche con membrana plasmatica distrutta e cromatina totalmente degradata, rigonfiamento nello spazio sub-acrosomiale, cromatina decondensata con lievi vacuolizzazioni (Fig. 8); numerosi erano anche gli spermatozoi con code aggregate tra loro (Fig. 9); in questo gruppo i mitocondri sono risultati rigonfi, con creste dilatate e vescicolate (Fig. 10).

Anche nel gruppo Vit SF sono state osservate sezioni di spermatozoi con code aggregate e ripiegate (Fig. 11) e con un acrosoma rotto, nucleo rigonfio e ridondante (Fig. 12).

La valutazione quantitativa dei principali risultati relativi alla valutazione ultrastrutturale è riportata nei grafici 1 e 2.

# DISCUSSIONE

L'SF contiene alti livelli di fruttosio come principale fonte di energia e ioni metallici, come lo zinco, che contribuiscono a mantenere l'integrità della membrana plasmatica durante il congelamento (Saritha & Bongso, 2001). Si è dunque ipotizzato che contenga alcuni componenti con capacità crioprotettive e, a conferma di ciò, molti lavori hanno dimostrato che congelare gli spermatozoi con il liquido seminale migliori non solo i tassi di recupero dei parametri nemaspermici dopo lo scongelamento ma preservi anche l'integrità del DNA (Donnelly et al., 2001; Saritha & Bongso, 2001). Tuttavia lo stress ossidativo è un fenomeno che si verifica in circa la metà degli uomini infertili; a tal proposito, i ROS, che aumentano in seguito allo stress ossidativo, sembra siano generati dagli spermatozoi e dai leucociti presenti nel seme (Aitken & Clarkson, 1988; Tremellen, 2008) perciò in questi pazienti l'utilizzo di liquido seminale durante la crioconservazione potrebbe non avere dei vantaggi, ma piuttosto dei limiti legati ad un possibile aumento dei livelli di stress ossidativo.

Ecco perché abbiamo cercato di formulare un nuovo mezzo di coltura, l'ASF, che avesse delle caratteristiche simili al SF ma con delle modifiche che potessero crioconservare meglio le cellule. La formulazione di tale mezzo di coltura artificiale si basa su quanto proposto da Owen & Katz, 2005. Il nostro mezzo è a base di bicarbonato come il resto dei fluidi corporei, ha anche fonti energetiche come glucosio, fruttosio, lattato, piruvato che sono appunto presenti anche nel SF. Abbiamo aumentato la

concentrazione di Na e Cl per raggiungere un'osmolarità di  $320\pm 10$  e abbiamo aggiunto una buona dose di antiossidanti come l'acido ascorbico, urato e l'albumina (Smith et al., 1996; Gavella et al., 1997). Precedenti studi hanno dimostrato quanto l'integrazione di antiossidanti all'interno dei mezzi utilizzati per la crioconservazione migliorassero la motilità degli spermatozoi (Askari et al., 1997; Bilodeau et al., 2000; Pena et al., 2003).

I nostri risultati hanno dimostrato una ridotta motilità, vitalità ed un'alterata morfologia in tutti i gruppi di spermatozoi vitrificati. Diversi sono i tassi di recupero sulla motilità riportati in letteratura, fino al 60 e al 20%, dopo lo scongelamento in pazienti normospermici e oligoastenoteratozoospermici, rispettivamente (Isachenko et al., 2012). Nel nostro studio, la motilità progressiva risulta significativamente più alta nei Vit ASF.

È stato inoltre dimostrato quanto lo shock osmotico prodotto dai crioprotettori causi riduzione della motilità e della vitalità (Critser et al., 1988; Gao et al., 1995; Gao & Critser, 2000). Nel nostro progetto c'è una forte correlazione tra motilità e vitalità in tutti i gruppi (dato non ancora pubblicato); questo significa che la perdita della vitalità potrebbe essere la causa principale della riduzione della motilità.

L'aggiunta e la rimozione del saccarosio prima e dopo la vitrificazione causa shock osmotico. In un recente studio sono stati paragonati campioni di liquido seminale vitrificato secondo il metodo cryotop, con e senza l'aggiunta di saccarosio (cryotop è un dispositivo utilizzato come supporto



per il congelamento di gameti maschili e femminili, e prevede l'uso di una sottile e fine pellicola attaccata ad un piccolo supporto in plastica). Gli autori hanno riportato che spermatozoi crioconservati senza saccarosio avevano un'alta vitalità e un lieve danno a livello della cromatina rispetto a quelli crioconservati con il saccarosio; perciò nonostante questo crioprotettore non sia un elemento tossico di per sé, lo shock osmotico che esso provoca danneggia comunque le cellule congelate (Chen et al., 2015).

Nel nostro studio, la vitrificazione con ASF è l'unica condizione nella quale si è cercato di creare un ambiente isosmotico, riducendo quindi la probabilità che si verificasse uno shock osmotico. A tale proposito, va sottolineato come la motilità e la vitalità degli spermatozoi sono risultate significativamente più alte in Vit ASF rispetto a Vit HTF; gli stessi parametri, inoltre, risultano migliori in Vit ASF rispetto a Vit SF anche se solo la vitalità sembra differire in maniera significativa.

È stata in generale ampiamente dimostrata in letteratura una significativa riduzione della normale morfologia post scongelamento negli spermatozoi crioconservati. Anomalie a livello della coda e del tratto intermedio sono state riscontrate sia dopo l'esposizione ad un ambiente ipoosmotico, che dopo il passaggio da un ambiente iperosmotico ad uno isosmotico.

Inoltre risulta che la motilità è più sensibile rispetto all'integrità di membrana ad un ambiente isosmotico, e che la motilità è sostanzialmente più sensibile ad un ambiente ipotonico rispetto ad uno ipertonico (Gao et al., 1995). Anche altri autori hanno dimostrato un notevole incremento di

anomalie a livello delle code (Hammadeh et al., 2001b; Ozkavukcu et al., 2008; Satirapod et al., 2012). Nel nostro studio, il recupero della normale morfologia (tratto intermedio e code) è stato evidenziato soprattutto nei Vit ASF rispetto ai Vit HTF; il cambiamento strutturale anatomico degli spermatozoi è un forte indicatore di shock osmotico evidente nei Vit HTF rispetto ai Vit ASF; pertanto la condizione isosmotica creata ha migliorato i parametri di crioconservazione anche per quanto riguarda la morfologia nemaspermica.

Secondo Morris et al., 2012 il rapido raffreddamento durante la fase di scongelamento permette una massiva ricristallizzazione intorno alle cellule; queste erano quindi esposte a shock osmotico a basse temperature, causando danni cellulari specialmente alla membrana plasmatica (Morris et al., 2012). Un recente studio riporta che lo scongelamento a 42 °C per de-vitrificare gli spermatozoi umani è la temperatura ottimale necessaria per preservare motilità e vitalità (Mansilla et al., 2016). Analizzando tutti i metodi di vitrificazione è stato visto che non c'era ghiaccio intracellulare, questo significa che è sempre avvenuta vitrificazione in tutti i compartimenti intracellulari (Morris et al., 2007). Quindi il sistema per la crioconservazione deve essere progettato in modo tale che rimuova il ghiaccio intracellulare senza shock osmotico, con il risultato di avere meno danni da congelamento. Inoltre abbiamo implementato l'ASF con la metilcellulosa per avere una viscosità simile al SF, e secondo dati non ancora pubblicati, abbiamo dimostrato che l'aggiunta di questo componente migliora la vitalità degli spermatozoi probabilmente grazie

alla formazione di una sorta di capsula intorno alle cellule che le preserva dal ghiaccio.

L'ultrastruttura osservata mediante microscopio elettronico a trasmissione ha rivelato in genere negli spermatozoi diverse anomalie dopo crioconservazione, come ad esempio decomposizione del plasmalemma, reazione acrosomiale precoce, danni strutturali all'acrosoma, anomalie della cromatina (Ozkavukcu et al., 2008; Aydin et al., 2013). Nel nostro studio abbiamo dimostrato chiaramente, in tutti i gruppi di spermatozoi, quanto l'acrosoma sia sensibile al crio-danneggiamento. A tale proposito, va ricordato che, come proposto da Cross & Hanks, 1991, la perdita dell'acrosoma in seguito a congelamento sembra sia strettamente correlata alla morte cellulare.

Abbiamo anche dimostrato modifiche ultrastrutturali a livello mitocondriale simile a quanto dimostrato da Woolley & Richardson, 1978. In particolare, l'ordine e la distribuzione dei mitocondri sono risultati particolarmente alterati in alcune cellule. Isachenko et al., 2008 hanno dimostrato inoltre anche una diminuzione della loro funzionalità dopo vitrificazione; probabilmente la diminuzione di ATP potrebbe contribuire ad un calo della motilità (Watson, 1995); quindi l'arricchimento dei mezzi di vitrificazione con risorse energetiche potrebbe aiutare i mitocondri nella produzione di ATP. Nel nostro studio, questa condizione è stata riprodotta in ASF supportando la motilità degli spermatozoi molto di più rispetto ad HTF.

Si ritiene in generale che lo stato della membrana plasmatica influenzi molto il tasso di recupero dei parametri nemaspermici dopo congelamento e scongelamento (Watson 1995; Giraud et al., 2000). La formazione di cristalli di ghiaccio modifica la membrana degli spermatozoi rendendoli più reattivi, uno stato simile alla fase di capacitazione dopo lo scongelamento (Buhr et al., 1994); sia la capacitazione che la reazione acrosomiale hanno un incremento dopo la crioconservazione (Bailey et al., 2000; Isashenko et al., 2008; 2011). Questo causa un tasso di sopravvivenza limitata perché gli spermatozoi capacitati non hanno lunga vita. Spermatozoi crioconservati mostrano cambiamenti nella motilità, più probabilmente a causa del danno dovuto alla iperattività (Watson, 1995).

Nel nostro studio abbiamo osservato inoltre la cromatina particolarmente alterata; nei campioni a fresco era più condensata e con pochi piccoli vacuoli; questi vacuoli aumentavano in un certo numero di cellule appartenenti a tutti i gruppi vitrificati. In taluni casi un vacuolo presente all'interno del nucleo può espandersi e marginalizzare la cromatina; tuttavia questa forma di cromatina sembra causi danno al DNA solo in certi casi. Sono state infatti identificate differenze insignificanti per quanto riguarda l'integrità del DNA tra spermatozoi vitrificati e a fresco (Isashenko et al., 2004; Agha- Rahimi et al., 2014).

Abbiamo infine osservato diverse sezioni di coda aggregate ed aderenti, quasi come se ci fosse una vera e propria fusione delle membrane. Tali aspetti sono stati riscontrati soprattutto in Vit HTF e in Vit SF, suggerendo

che i danni ultrastrutturali sono particolarmente numerosi in questi due gruppi. Probabilmente una situazione osmotica più stabile, come nel caso dei Vit ASF, impedisce gravi ripiegamenti delle code.

Come è apparso dai dati riportati e discussi, abbiamo osservato risposte molto differenti alla crioconservazione in tutti i gruppi studiati. Anche nell'ambito del Vit SF sono state identificate una vasta gamma di differenze; ultimamente è stato infatti dimostrato come la resilienza al congelamento sia strettamente dipendente dalla composizione del plasma seminale (Rickard et al., 2014).

## CONCLUSIONI

Possiamo quindi concludere che il liquido seminale può fungere da crioprotettore in soggetti normospermici. Il nostro studio dimostra inoltre che l'ASF può effettivamente preservare tutti i parametri nemaspermici degli spermatozoi in confronto al SF, ma soprattutto in confronto al HTF, incrementato con albumina sierica e saccarosio.

# BIBLIOGRAFIA

- Acien P. (1993) Reproductive performance of women with uterine malformations. *Hum Reprod* 8, 122-6.
- Agha-Rahimi A, Khalili MA, Nabi A & Ashourzadeh S. (2014) Vitriification is not superior to rapid freezing of normozoospermic spermatozoa: effects on sperm parameters, DNA fragmentation and hyaluronan binding. *Reprod Biomed Online* 28, 352-358.
- Aitken R & Clarkson JS. (1988) significance of reactive oxygen species and antioxidants in difining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9, 367-376.
- Argyle CE, Harper JC & Davies MC. (2016) Oocyte cryopreservation: where are we now? *Hum Reprod Update* 22, 440-9.
- Askari H, Check J, Peymer N & Bollendorf A. (1994) Effect of natural antioxidants tocopherol and ascorbic acids in maintenance of sperm activity during freeze-thaw process. *Arch Androl* 33, 11-15.
- Aydin MS, Senturk GE & Ercan F. (2013) Cryopreservation increases DNA fragmentation in spermatozoa of smokers. *Acta Histochem* 115, 394-400.
- Baigorri BF & Dixon RG. (2016) Varicocele: A review. *Semin Intervent Radiol* 33, 170-6.
- Bailey JL, Blodeau JF & Cormier N. (2000) Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon mini review. *J Androl* 21, 1-7.

- Bianchi V, Macchiarelli G, Borini A, Lappi M, Cecconi S, Miglietta S, Familiari G, Nottola SA. (2014) Fine morphological assessment of quality of human mature oocytes after slow freezing or vitrification with a closed device: a comparative analysis. *Reprod, Biol Endocrinol* 24, 12:110.
- Bilodeau JF; Chatterjee s, Sirard MA & Gagnon C. (2000) Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. *Mol Reprod dev* 55, 282-288.
- Borg CL, Wolski KM, Gibbs GM, O'Bryan MK. (2009) Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a “non-performer”. *Hum Reprod Update* 16, 205-24.
- Bracken MB, Eskenazi B, Sachse K, McSharry JE, Hellenbrand K, Leo-Summers L. (1990) Association of cocaine use with sperm concentration, motility and morphology. *Fertil Steril* 53, 315-22.
- Buhr M, Curtis E & Kakuda NS. (1994) Composition and behavior of head membrane lipids of fresh and cryopreserved boar sperm. *Cryobiology* 31, 224-238.
- Chen Y, Li L, Qian Y, Xu C, Zhu Y, Huang H, Jin F & Ye Y. (2015) Small volume vitrification for human spermatozoa in the absence of cryoprotectants by using Cryotop. *Andrologia* 47, 694-699.
- Chian RC, Cao YX. (2009) Clinical evidence of oocytes vitrification. *Informa Healthcare* 246-55.
- Comhaire FH, Rowe PJ, Farley TMM. (1988) How should we evaluate infertility in men and in women. *Acta Clin Belg* 43, 78-85.



Critser J, Huse-Benda A, Aaker D, Arneson B & Ball GD. (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. III: the effects of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 50, 314.

Cross NL & Hanks SE. (1991) Effects of cryopreservation on human sperm acrosomes. *Human Reprod* 6, 1279-1283.

Cross

Cui D, Han G, Shang Y, Liu C, Xia L, Li L, Yi S. (2015) Antisperm antibodies in infertile men and their effect on semen parameters: a systematic review and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 444, 29-36.

Docampo MJ & Hadziselimovic F. (2015) Molecular pathology of cryptorchidism-induced infertility. *Sex Dev* 9, 269-78.

Domingo J & Garcia-Velasco JA. (2016) Oocyte cryopreservation for fertility preservation in women with cancer. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 23, 465-469.

Donnelly ET, McClure N & Lewis SE. (2001) Cryopreservation of human semen and prepared sperm: effects on motility parameters and DNA integrity. *Fertil Steril* 76, 892-900.

Fadini R, Brambillasca F, Renzini MM, Merola M, Comi R. (2009) Human oocytes cryopreservation: comparison between slow and ultrarapid methods. *Reprod Bio Med Online* 19, 181-90.

Gao D & Critser J. (2000) Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR J* 41, 187-196.

Gao D, Liu J, Liu C, McGann L, Watson P, Kleinhans F, Mazur P, Critser E & Critser J. (1995) Andrology: prevention of osmotic injury to human

spermatozoa during addition and removal of glycerol. *Hum Reprod* 10, 1109-1122.

Gabrielsen JS & Tanrikut C. (2016) Chronic exposure and male fertility: the impacts of environment, and drug use on spermatogenesis. *Andrology* 4, 648-61.

Gandini L, Lombardo F, Paoli D, Caponecchia L, Familiari G, Verlengia C, Dondero F, Lenzi A. (2000) Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 830-9.

Gavella M, Lipovac V, Vučić M & Ročić B. (1997) Evaluation of ascorbate and urate antioxidant capacity in human semen. *Andrologia* 29, 29-35.

Giraud M, Motta C, Boucher D & Grizard G. (2000) Membrane fluidity predicts the outcome of cryopreservation of human spermatozoa. *Hum Reprod* 15, 2160-2164.

Goluboff ET, Stifelman MD, Fish H. (1995) Ejaculatory duct of obstruction in the infertile male. *Urology* 45, 925-31.

Graziotti P, Lembo A, Zanchetta R. (1981) Fertility and sterility after torsion of the spermatic cord. *Urologia* 48, 700-707.

Graziottin A. (1989) Aspetti psicosessuali nel maschio infertile. *Atti del II Corso di Andrologia*.

Griswold MD. (2016) Spermatogenesis: The commitment to Meiosis. *Physiol Rev* 96, 1-17.

Hammadeh M, Szarvasy D, Zeginiadou T, Rosenbaum P, Georg T & Schmidt W. (2001a) Andrology: evaluation of cryoinjury of spermatozoa

after slow (programmed biological freezer) or rapid (liquid nitrogen vapour) freeze-thawing techniques. *J Assist Reprod Genet* 18, 364-370.

Hammadeh ME, Dehn C, Hippach M, Zeginiadou T, Stieber M, Georg T, Rosenbaum P & Schmidt W. (2001b). Comparison between computerized slow-stage and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *Int J Androl* 24,66-72.

Homan GF, Davies M & Norman R. (2007) The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update* 13, 209-223.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Dessole S & Nawroth F. (2003) Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reprod Biomed Online* 6, 191-200.

Isachenko E, Isachenko V, Katkov II, Rahimi G, Schondorf T, Mallmann P, Dessole S, Nawroth F. (2004a) DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum Reprod* 19, 932-939.

Isachenko V, Isachenko E, katkov II, Montag M, Dessole S, Nawroth F & Van Der Ven H. (2004b) Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol Reprod* 71, 1167-1173.

Isachenko E, Isachenko V, Weiss JM, Kreinberg R, Li Katkov, Shulz M, Lulat AG, Risopatron MJ & Sanchez R. (2008) Acrosomal status and mitochondrial activity of human spermatozoa vitrified with sucrose. *Reproduction* 136, 167-173.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina AM, Mallmann P, Rahimi G, Sterzik K, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I & Isachenko E. (2011) Cryoprotectant-free vitrification of human spermatozoa in large (up to 0.5 mL) volume a novel technology. *Clin Lab* 57, 643-650.

Isachenko V, Maettner R, Petrunkina A, Sterzik K, Mallmann P, Rahimi G, Sanchez R, Risopatron J, Damjanoski I & Isachenko E. (2012) Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *J Androl* 33, 462-468.

Jhon Morris G, Acton E, Murray BJ, & Fonseca F. (2012) Freezing injury: the special case of the sperm cell. *Cryobiology* 64, 71-80.

Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Ligocka D, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. (2014) Lifestyle and semen quality: role of modifiable risk factors. *Syst Biol Reprod Med* 60, 43-51.

Jurewicz J, Radwan M, Sobala W, Radwan P, Bochenek M, Hanke W. (2016) Dietary patterns and their relationship with semen quality. *Am J Mens Health*. Epub ahead of print.

Karamanou M, Poulakou-Rebelakou E, Tzetis M, Androutsos G. (2010) Anton van Leeuwenhoek (1632-1723): father of micromorphology and discoverer of spermatozoa. *Rev Argent Microbiol* 42, 311-4.

- Khalili MA, Adib M, Halvei I & Nabi A. (2014) Vittrification of neat semen alters sperm parameters and DNA integrity. *Urol J* 11, 1465-1470.
- Kitaya K, Matsubayashi H, Takaya Y, Nishiyama R, Yamaguchi K, Ishikawa T. (2016) Clinical background affecting pregnancy outcome following local endometrial injury in infertile patients with repeated implantation failure. *Gynecol Endocrinol* 32, 587-90.
- Krzemiński A. (1975) Studies on the immunological factor in the sterility of married couples. *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska Med* 30, 168-73.
- Lanzerdorf SE, Maloney M, Ackerman S, Acosta A, Hodgen G. Fertilizing potential of acrosome-defective sperm following microsurgical injection into eggs. *Gamete Res* 19, 329-37.
- Mansilla M, Merino O, Risopatròn J, isachenko V, Isachenko E & Sanchez R. (2016) High temperature is essential for preserved human sperm function during the devitrification process. *Andrologia* 48, 111-113.
- Mori K, Yumura Y, Takeshima T, Yamanaka H, Kuroda S, Saniyo H, Yasuda K, Noquchi K. (2015) A case of Kartagener's Syndrome in infertile male patients. *Hinyokika Kiyo* 61, 509-13.
- Morris G, Faszter K, Green J, Draper D, Grout B & Fonseca F. (2007) Rapidly cooled horse spermatozoa: loss of viability is due to osmotic imbalance during thawing, not intracellular ice formation. *Theriogenology* 68,804-812.
- Morse CA & Van Hall EV. (1987) Psychosocial aspects of infertility: a review of current concept. *J Psycosom Obstet Gynaecol* 6,157-164.

Nawroth F, Isachenko V, Dessole S, Rahimi G, Farina M, Vargiu N, Mallmann P, Dattena M, Capobianco G, & Peters D. (2002) Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo Lett* 23,93-102.

Ostrowski KA & Walsh TJ. (2015) Infertility with testicular cancer. *Urol Clin North Am* 42, 409-20.

Owen DH & Katz DF. (2005) A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *J Androl* 26, 459-469.

Ozkavukcu S, Erdemli E, Isik A, Oztuna D & Karahuseynoglu S. (2008) Effects of cryopreservation on sperm parameter and ultrastructural morphology of human spermatozoa. *J Assist Reprod Genet* 25, 403-411.

Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992) Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 340, 17-18.

Pena F, Johannisson A, Wallgren M & Rodriguez Martinez H. (2003) Antioxidant supplementation in vitro improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. *Anim Reprod Sci* 78, 85-98.

Pralea CE & Mihalache G. (2007) Importance of Klinefelter syndrome in the pathogenesis of male infertility. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi* 111, 373-8.

Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O et al. (1995) Diverse spermatogenic defects

in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 10, 383-393.

Ricci G, Boscolo R, Martinelli M, Fisher-Tamaro L. (2013) Tubal factor infertility and perinatal risk after assisted reproductive technology. *Obstet Gynecol* 122, 908-9.

Rickard J, Schmidt R, Maddison J, Bathgate R, Lynch G, Druart X, & De Graaf S. (2014) Variation in seminal plasma alters the ability of ram spermatozoa to survive cryopreservation. *Reprod Fertil Dev* 28, 516-523.

Saritha K & Bongso A. (2001) Comparative evaluation of fresh and washed human sperm cryopreserved in vapor and liquid phases of liquid nitrogen. *J Androl* 22, 857-862.

Sathananthan AHE. (1996) *Visual Atlas of Human Sperm structure and Function For Assisted Reproductive Technology*. National University Hospital and Serono, Singapore.

Satirapod C, Treetampinich C, Weerakiet S, wongkularb A, Rattanasiri S & Choktanasiri W. (2012) Comparison of cryopreserved human sperm from solid surface vitrification and standard vapor freezing method: on motility, morphology, vitality and DNA integrity. *Andrologia* 44 (suppl 1), 786-790.

Schmid TE, Eskenazi B, Baumgartner A, Marchetti F, Young S, Weldon R, Anderson D, Wyrobek AJ. (2007) The effect of male age on sperm DNA damage in healthy non-smokers. *Hum Reprod* 22, 180-187.

Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Meinhardt A, Bergmann M, Haidl G, Weidner W. (2010) Orchitis and male infertility. *Urologe A* 49, 629-35.

Seibel MM & Taymor ML. (1982) Emotional aspects of infertility. *Fertil & Steril* 37, 137-145.

Smith R, Vantman D, Ponce J, Escobar J & Lissi E. (1996) Andrology: total antioxidant capacity of human seminal plasma. *Hum Reprod* 11, 1655-1660.

Song GJ, Lee H, Park Y, Lee HJ, Lee YS, Seo JT, Kang IS. (2000) Expression pattern of germ cell-specific genes in the testis of patients with nonobstructive azoospermia: usefulness as a molecular marker to predict the presence of testicular sperm. *Fertil & Steril* 73, 1104-1108.

Spinapolice A. (2014) Fecondazione assistita: tutto quello che c'è da sapere sul percorso della maternità biologica assistita. *Bruno Editore*.

Stephoe PC & Edwards RG. (1978) Birth after reimplantation of human embryo. *The Lancet* 2, 366.

Sullivan R & Mieusset R. (2016) The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum Reprod Update* 22, 574-87.

Tremellen K. (2008) Oxidative stress and male infertility – a clinical prospective. *Hum Reprod Update* 14,243-258.

Trounson A, Anderiesz C, Jones G. (2001) Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction* 121, 51-57.

Vignati R. (2011) Il problema della sterilità nella coppia: scenari di un evento imprevisto tra desiderio e frustrazione. *Psychomedia Telematic Review*.



Watson P. (1995) Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 7, 871-891.

Wilkowska-Trojnieł M, Zdrodowska-Stefanow B, Ostaszewska-Puchalska I, Zbucka M, Wolczynski W, Zdrodowski M. (2009) Chlamydia trachomatis urogenital infection in women infertility. *Adv Med Sci* 54, 82-5.

Woolley D & Richardson D. (1978) Ultrastructural injury to human spermatozoa after freezing and thawing. *J Reprod Fertil* 53, 389-394.

World Health organization (2010) WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5<sup>th</sup> ed. World Health Organization. Genova.

Wright J, Allard M, Lecours A & Sabourin S. (1989) Psychosocial distress and infertility: a review of controlled research. *Int J Fertil* 31, 126-142.

Zollner U, Lanig K, Dietl J. (2001) Assessment of endocrine status in patients undergoing in-vitro fertilization treatment. Is it necessary? *Arch Gynecol Obstet* 265, 16-20.

## DIDASCALIE DELLE FIGURE

**Figure 1a e 1b:** spermatozoi a fresco. L'acrosoma appare intatto e con una densità omogenea; il nucleo appare addensato, privo di grandi vacuoli; la membrana plasmatica appare intatta.

**Figure 2a e 2b:** spermatozoi a fresco. Sono presenti piccoli vacuoli a livello della testa e, in posizione centrale, apparati membranosi sotto forma di inclusioni nucleari.

**Figure 3a e 3b:** spermatozoi a fresco in sezione longitudinale. I mitocondri sono arrangiati in maniera irregolare, provvisti di numerose creste e con un spazio intermembrana ridotto.

**Figure 4a e 4b:** spermatozoi vitrificati in ASF (Vit ASF). Si notano un acrosoma intatto e un nucleo con cromatina densa e omogenea.

**Figura 5:** spermatozoi vitrificati in ASF (Vit ASF). Si notano una cromatina leggermente granulare e una perdita della membrana plasmatica.

**Figura 6:** spermatozoi vitrificati in ASF (Vit ASF). I mitocondri appaiono rigonfi con creste dilatate e non particolarmente nitide.

**Figura 7:** spermatozoi vitrificati in HTF (Vit HTF). La maggior parte mostrano acrosomi rigonfi e perdita di membrana plasmatica nella regione del collo, cromatina decondensata, nucleo ridondante.

**Figura 8:** spermatozoi vitrificati in HTF (Vit HTF). Lo spermatozoo di sinistra risulta necrotico, con membrana plasmatica distrutta e cromatina degradata; quello di destra mostra un acrosoma rigonfio e danneggiato, uno spazio sub-acrosomiale dilatato e con membrana frastagliata; si notano anche due code in sezione trasversale che aderiscono alla testa, con un riarrangiamento della tubulina anormale.

**Figura 9:** spermatozoi vitrificati in HTF (Vit HTF). Sono particolarmente evidenti aggregati di code, ripiegate e associate tra loro.

**Figura 10:** spermatozoi vitrificati in HTF (Vit HTF). Le creste mitocondriali appaiono vescicolate con grossi spazi bianchi, segni evidenti di rigonfiamento.

**Figura 11:** spermatozoi vitrificati in SF (Vit SF). Si osservano teste con grossi spazi bianchi all'interno del nucleo; si notano inoltre numerose sezioni di code, aggregate tra loro e alle teste degli spermatozoi stessi.

**Figura 12:** spermatozoi vitrificati in SF (Vit SF). Le teste mostrano voluminosi spazi vuoti all'interno del nucleo; l'acrosoma appare distrutto e il nucleo rigonfio e ridondante.

# TABELLE E GRAFICI

**Tabella 1**

Components (mg/100 mL)	HTF medium	ASF
Na	340	378.67
Cl	387.92	236.43
K	190.21	108.3
Ca	8.1	20
Mg	0.49	11
Lactate	183.01	62
Pyruvate	2.8	29
HAS	5	11
Glucose	50	102
Fructose	–	272
Citrate	–	528
Zn	–	11.3
Urea	–	72
Urate	–	7.1
Ascorbic acid	–	10
Human serum albumin	500	1100

Componenti chimici dei media Human Tubal Fluid (HTF) e Artificial Seminal Fluid (ASF).

**Tabella 2**

Parameters (%)	Fresh HTF	Vit HTF	Fresh ASF	Vit ASF	Vit SF
Progressive motility	83.68 ± 4.94 <sup>a</sup>	36.80 ± 13.75 <sup>b,c</sup>	86.09 ± 4.44 <sup>a</sup>	46.09 ± 10.33 <sup>d</sup>	41.70 ± 12.70 <sup>b</sup>
Total motility	94.53 ± 3.70 <sup>a</sup>	53.70 ± 11.16 <sup>b</sup>	95.25 ± 2.99 <sup>a</sup>	52.34 ± 10.65 <sup>b</sup>	47.73 ± 10.67 <sup>b</sup>
Viability	94.84 ± 3.01 <sup>a</sup>	60.86 ± 11.72 <sup>b,f</sup>	95.62 ± 2.67 <sup>a</sup>	68.22 ± 10.83 <sup>b,g</sup>	59.65 ± 14.55 <sup>b,h</sup>
Normal morphology	21.51 ± 7.16 <sup>a</sup>	11.85 ± 5.84 <sup>b,i</sup>	23.44 ± 6.35 <sup>a</sup>	18.74 ± 8.35 <sup>b,j</sup>	14.00 ± 6.84 <sup>b</sup>

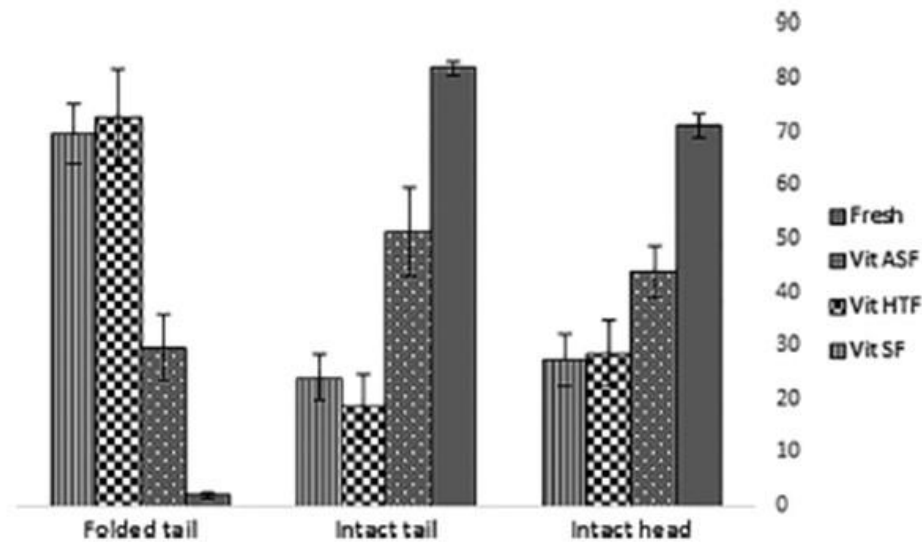
Parametri degli spermatozoi dopo vitrificazione nelle diverse condizioni di congelamento.

**Tabella 3**

Recovery rate (%)	Vit HTF	Vit ASF	Vit SF
Progressive motility	44.02 ± 16.37 <sup>a</sup> (11.11–70.00)	53.54 ± 11.65 <sup>b</sup> (31–74)	49.97 ± 15.85 (17–68)
Total motility	56.82 ± 11.38 (37.8–78.57)	54.98 ± 11.25 (32.63–72.73)	50.18 ± 11.35 (28.72–73.86)
Viability	64.14 ± 11.99 <sup>c</sup> (40.00–87.10)	71.32 ± 10.81 <sup>d</sup> (40.00–91.40)	62.66 ± 15.62 <sup>e</sup> (19.57–86.02)
Normal morphology	55.49 ± 22.69 <sup>f</sup>	77.14 ± 25.86 <sup>g</sup>	61.40 ± 21.00 <sup>h</sup>

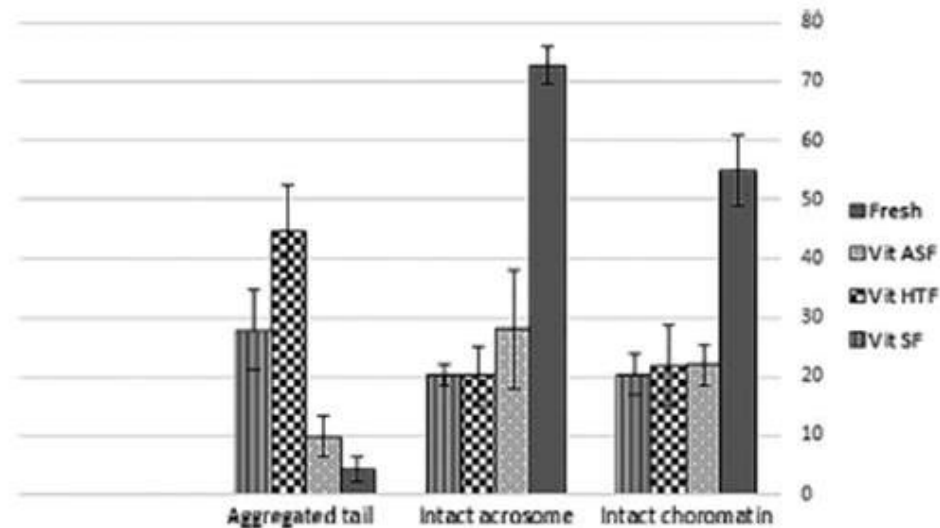
Tassi di recupero nemaspermici post scongelamento.

**Grafico 1**



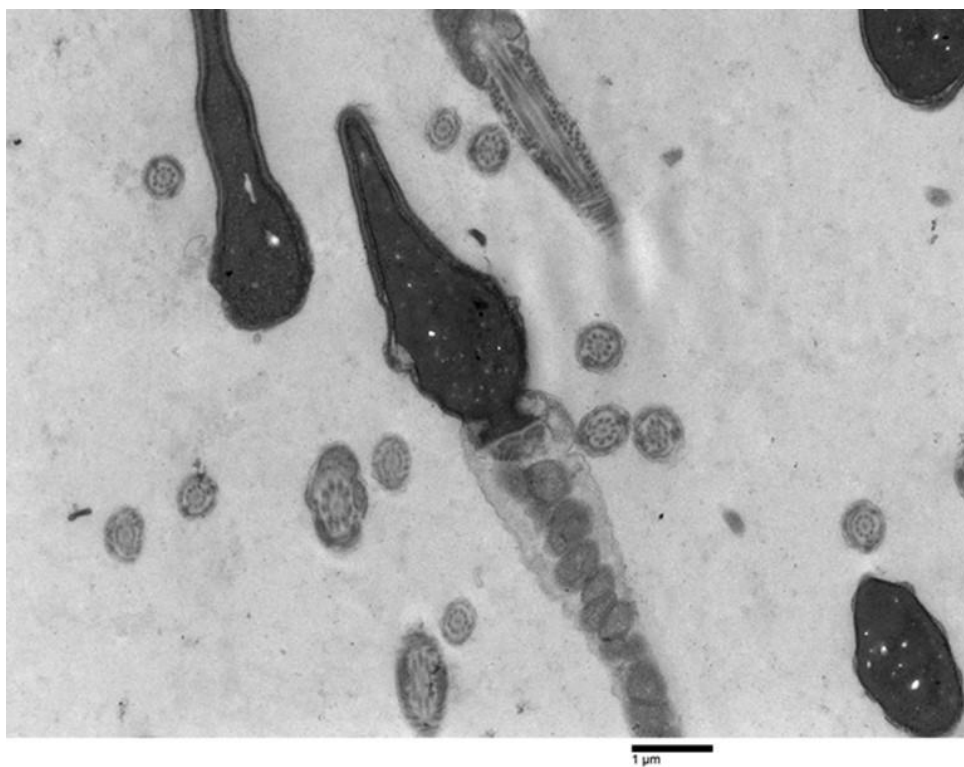
Comparazione tra teste intatte, code intatte e code ripiegate in spermatozoi a fresco e vitrificati. In tutti i gruppi code e teste intatte diminuiscono significativamente mentre il numero delle code ripiegate aumenta significativamente dopo vitrificazione ( $p < 0.05$ ). Il numero delle code ripiegate è significativamente più alto nei gruppi Vit HTF e Vit SF rispetto ai Vit ASF ( $p < 0.05$ ).

**Grafico 2**

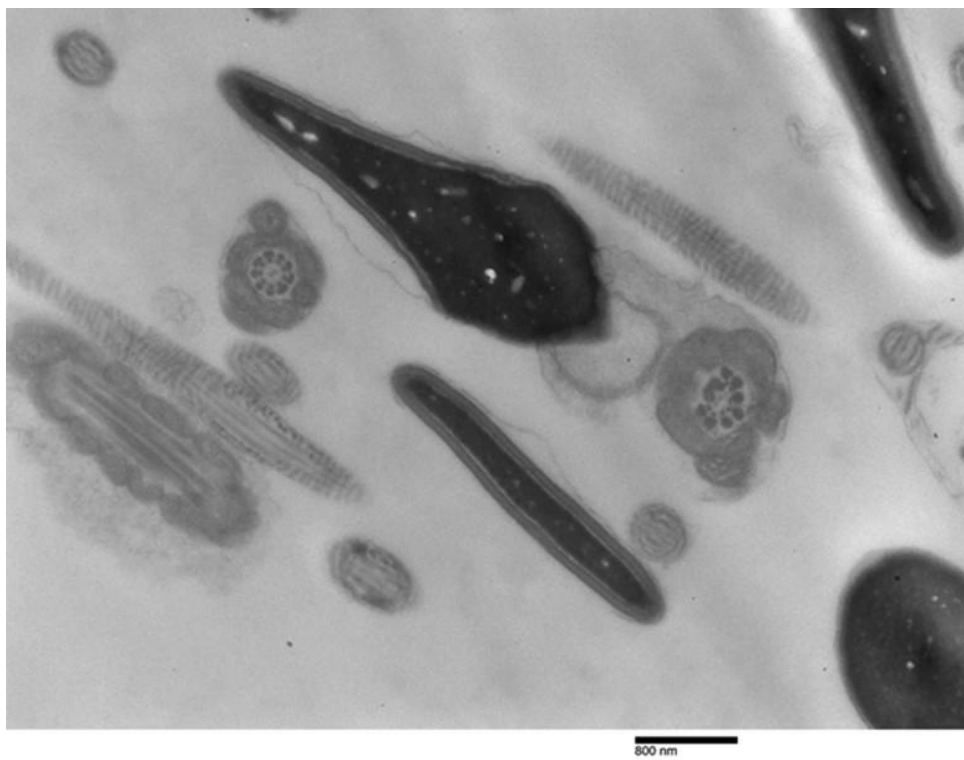


Comparazione tra stato della cromatina, integrità dell'acrosoma e aggregati di code in gruppi a fresco e vitrificati. In tutti i gruppi vitrificati diminuisce significativamente l'integrità sia della cromatina che dell'acrosoma, mentre aumentano gli aggregati di code dopo la vitrificazione ( $p < 0.05$ ). Gli aggregati di code risultano più numerosi nei gruppi Vit HTF e VitSf rispetto ai Vit ASF ( $p < 0.05$ ).

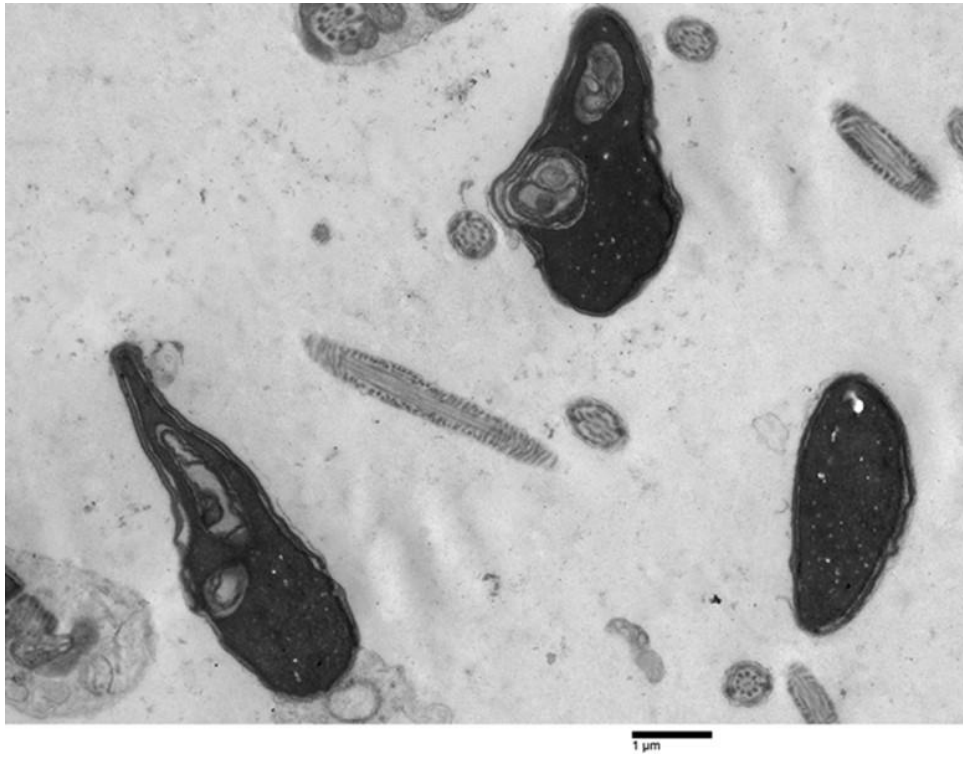
# ICONOGRAFIA



**Figura 1a**



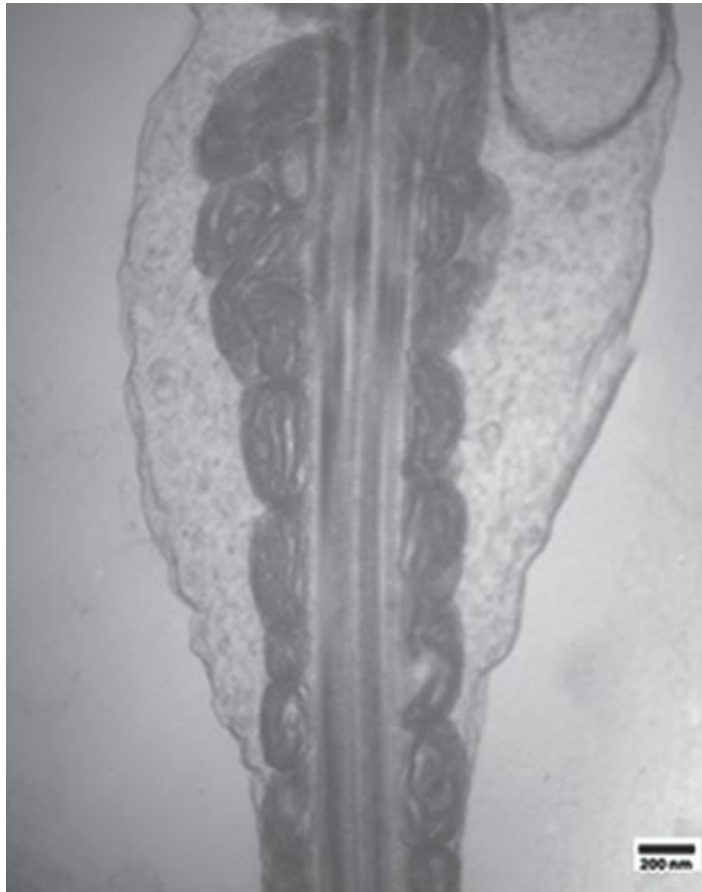
**Figura 1b**



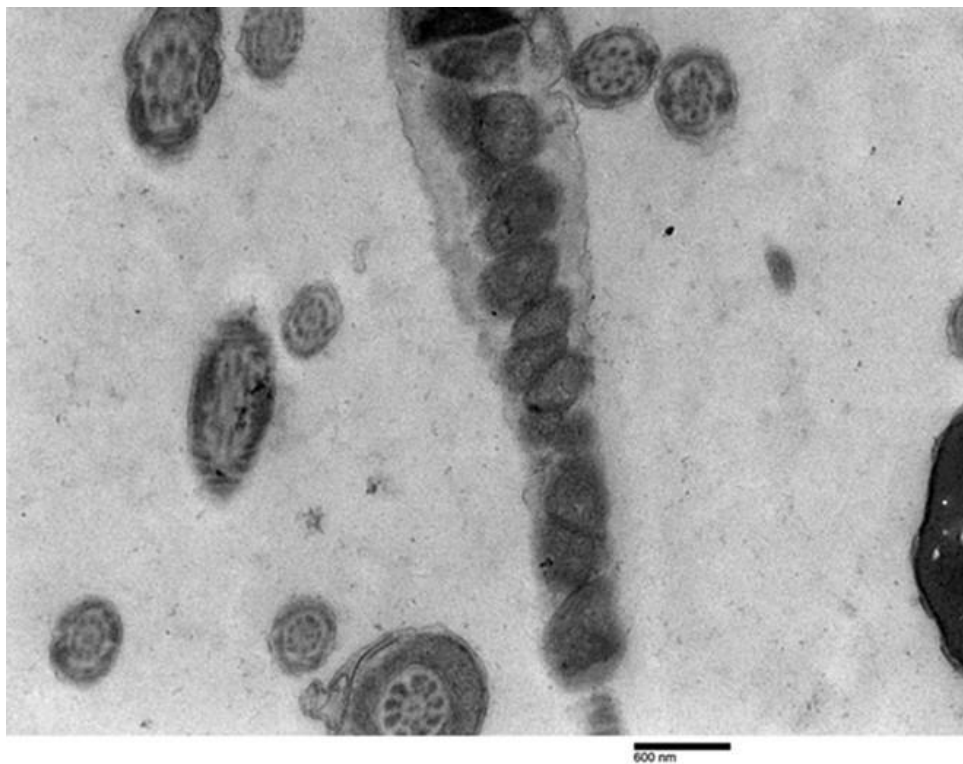
**Figura 2a**



**Figura 2b**

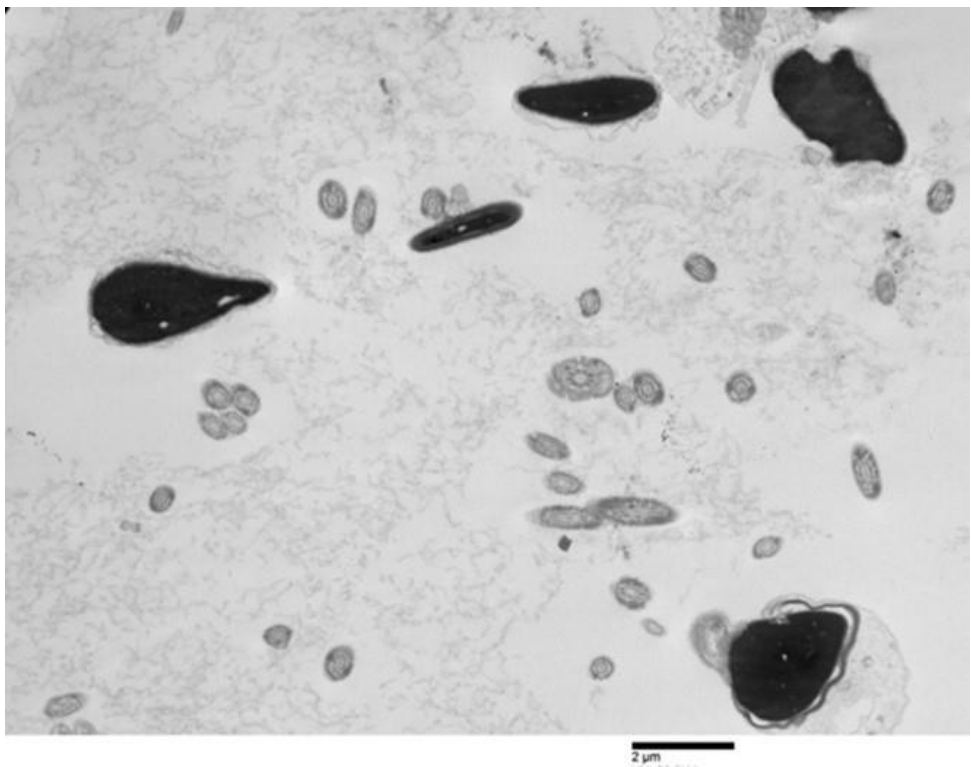


**Figura 3a**

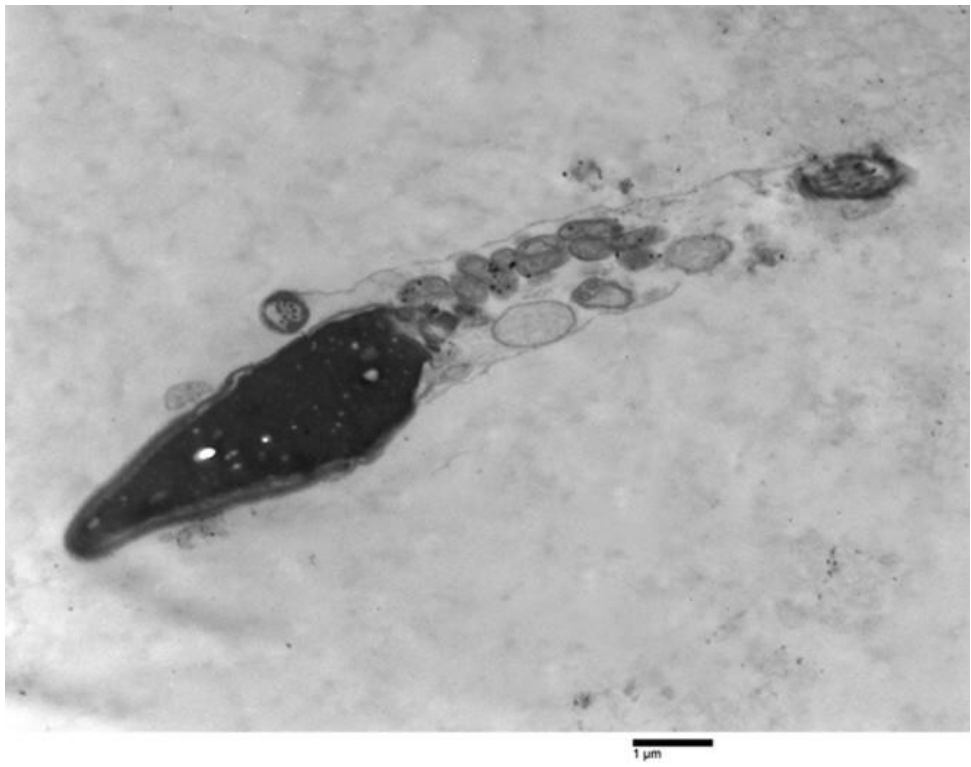


**Figura 3b**

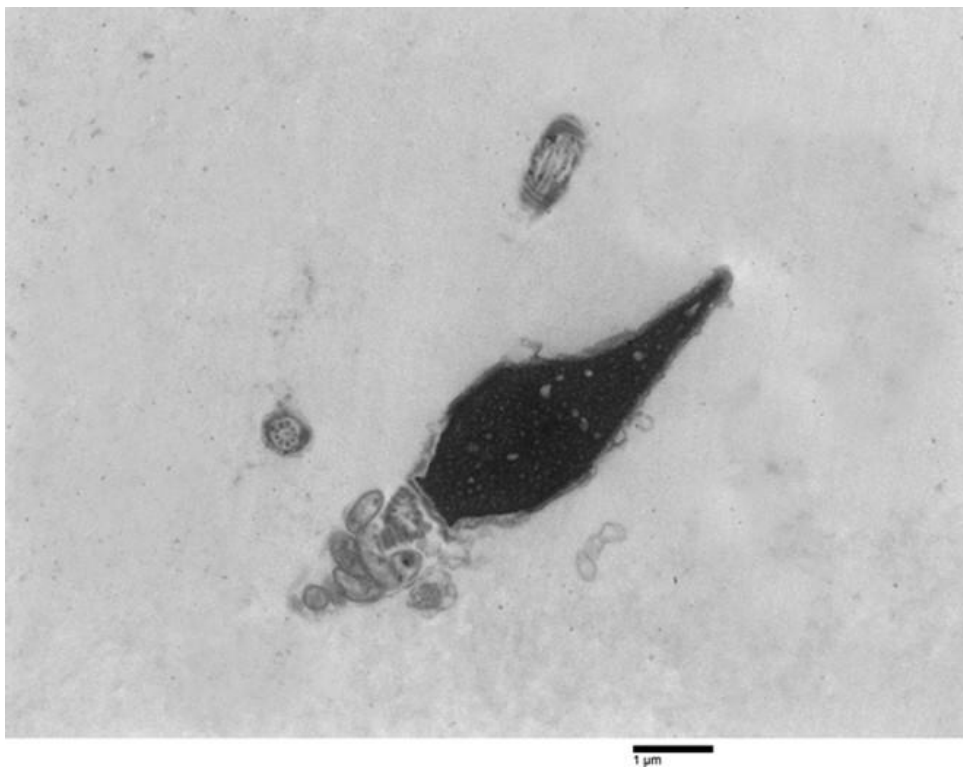




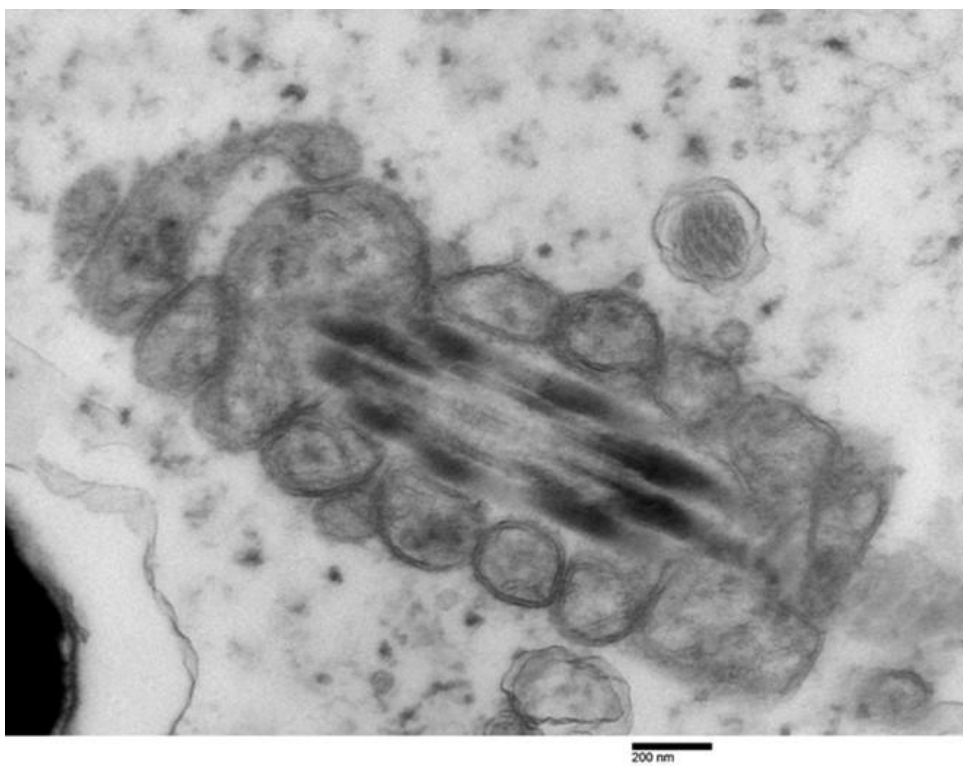
**Figura 4a**



**Figura 4b**



**Figura 5**



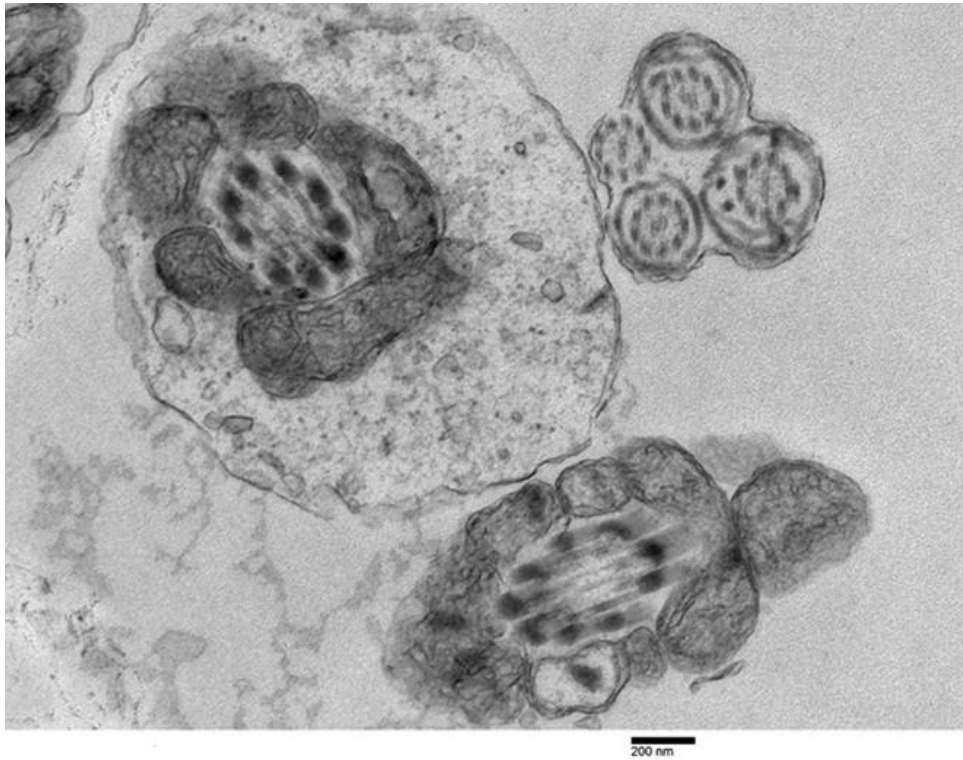
**Figura 6**



**Figura 7**



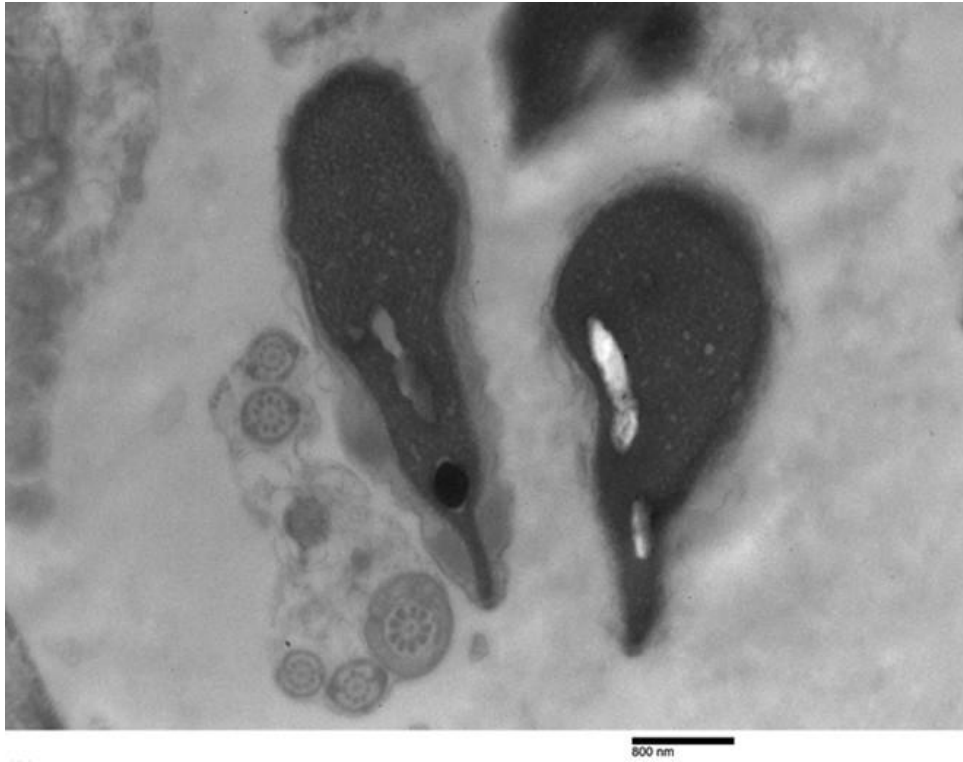
**Figura 8**



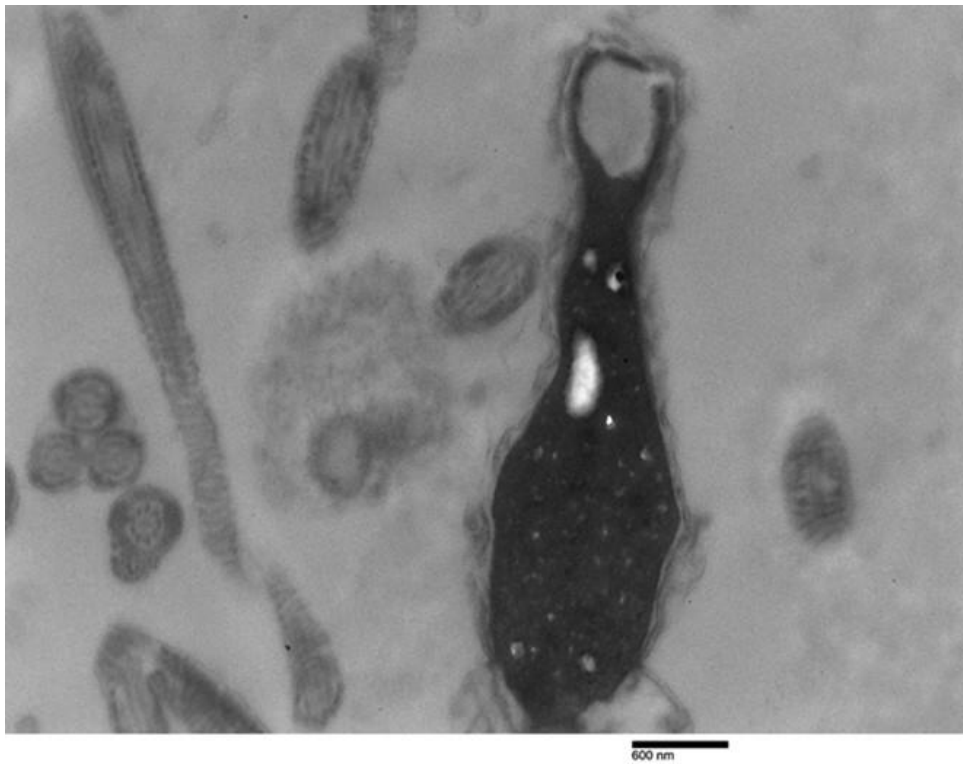
**Figura 9**



**Figura 10**



**Figura 11**



**Figura 12**